

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie

Charité Campus Virchow-Klinikum

Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

(Direktor: Professor Dr. med. Ulrich Wahn)

Exposition gegenüber Dioxinen und verwandten Substanzen

– ein Risiko für Säuglinge?

Habilitationsschrift

zur Erlangung der Venia legendi für das Fach Pädiatrie

an der Charité, Medizinische Fakultät der Humboldt-Universität zu Berlin

vorgelegt von

Dr. med. Klaus Abraham

Berlin 2002

Präsident: Prof. Dr. rer. Nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. H. Greim, München

2. Prof. Dr. med. K.E. von Mühlendahl, Osnabrück

Datum des öffentlich-wissenschaftlichen Vortrages: 28.01.2003

Inhaltsverzeichnis

Einleitung	4
Der Seveso-Unfall	4
Was sind Dioxine ?	6
Probleme bei der Risiko-Abschätzung	8
Eigene Forschungsarbeiten	12
Zusammenfassung der Projektergebnisse	16
Literatur	20
Danksagung	24

Anhang 1

Projektbericht: „Belastung von Säuglingen mit polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen (PCDDs), Dibenzofuranen (PCDFs) und Biphenylen (PCBs) und deren Auswirkung auf sensible biologische Parameter“

Anhang 2

Projektbericht: „Veränderungen biologischer Parameter (Immunsystem, Cytochrom P450-System) bei 3 hoch 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)-exponierten Personen aus Wien“

Einleitung

Der Seveso-Unfall

Am 10. Juli 1976 ereignete sich im nördlich von Mailand gelegenen Ort Seveso ein folgenschwerer Unfall: In der chemischen Fabrik ICMESA (Industria Chimica Meda Società Anonima), in der Intermediärprodukte für die Industrie hergestellt wurden, kam es bei der Produktion von 2,4,5-Trichlorphenol aus 1,2,4,5-Tetrachlorphenol und Natriumhydroxid zu einer Überhitzung des Kessels. Bekannt war, daß eine zu hohe Betriebstemperatur zu weiteren chemischen Reaktionen führt, die auch zur Bildung von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin (TCDD, „Seveso-Dioxin“) führt – einer Verbindung mit extrem hohem toxischen Potential. Der steigende Druck im Kessel führte bei Versagen des Überdruckventils schließlich zum Bersten und zur Freisetzung der darin enthaltenen Substanzen über mehrere Stunden. Der zu dieser Zeit wehende Wind bewirkte die Verteilung auf einen mehrere Kilometer langen Streifen von ca. 1800 Hektar in südöstlicher Richtung, der hauptsächlich die Gemeinden Seveso, Meda, Desio, Cesano und Maderno betraf. Bewohner nahmen als Emission zunächst nur die schlecht riechende Wolke war; einige berichteten über Übelkeit, Kopfschmerzen und Reizung der Konjunktiven. Die Firmenleitung empfahl, auf den Verzehr an selbst angebautem Obst und Gemüse sowie von gehaltenen Tieren zu verzichten (FARA 1999; SIGNORINI et al, 2000). Nach einigen Tagen kam es zum Verenden der ersten Vögel und Kaninchen, und bei Kindern, die sich tagsüber überwiegend außerhalb des Hauses aufgehalten hatten, zeigten sich erste Zeichen einer Hautentzündung. Insgesamt litten in den folgenden Wochen ca. 500 Personen unter vorübergehenden Hautirritationen (Kontaktdermatitis, vermutlich vornehmlich durch das in der Wolke enthaltenen Natriumhydroxid), aber bei 187 Einwohnern von Seveso, von denen 88 % Kinder waren, entwickelte sich eine gravierende Hautveränderung in Form einer sogenannten Chlorakne. Am schwersten betroffen (Schweregrad III und IV) waren 19 Kinder der der Fabrik am nächsten liegenden Zone (SIGNORINI et al, 2000). Der Begriff der Chlorakne wurde erstmals 1899 von Herxheimer bei gegenüber halogenierten Verbindungen exponierten Arbeitern benutzt (HERXHEIMER 1899).

Als wesentliche toxische Substanz in der freigesetzten Wolke wurde früh 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin vermutet. Erste Analysen im Kessel und Bodenanalysen bestätigten den Verdacht. Zu diesem Zeitpunkt war das Wissen über diese Verbindung noch sehr beschränkt, vergleichbare Katastrophen hatte es bisher nicht gegeben. Systematische

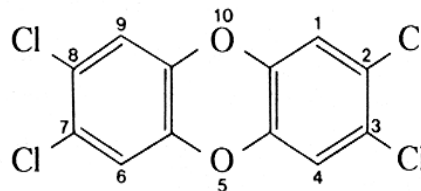
Bodenanalysen ergaben ein grobes Bild der Kontamination, das zur Festlegung von 3 Zonen führte: die höchstbelastete Zone A (80 Hektar, durchschnittlich 230 µg TCDD/m², 736 Einwohner), die deutlich weniger belastete Zone B (269 Hektar, durchschnittlich 3,0 µg TCDD/m², 4737 Einwohner) sowie die umgebende Zone R (1430 Hektar, durchschnittlich 0,9 µg TCDD/m², 31 800 Einwohner). Die Einwohner der Zone A wurden innerhalb von 15 Tagen evakuiert; später wurde die gesamte Fläche dieser Zone versiegelt und in einen Park umgewandelt (MOCARELLI et al, 1999).

Die Bilder der von Chlorakne betroffenen Seveso-Kinder gingen um die Welt: von Zysten übersäte Gesichter, die teilweise in dicke Verbände gehüllt waren. Bilder, die in der Öffentlichkeit Ängste mobilisierten vor einer extrem toxischen Substanz („Supergift Dioxin“), die zu klinischen Symptomen bereits bei kleinsten Konzentrationen führt, die der Mensch weder mit seinen Sinnesorganen wahrnehmen noch beim damaligen Stand der Technik in Blut- oder Gewebeproben messen konnte. Erst Mitte der 80er Jahre gelang der Nachweis von Dioxinen in der Muttermilch und am Ende des Jahrzehnts auch in Blutproben. Damit zeigte sich ein weiteres Problem, das der chronischen Exposition der Bevölkerung gegenüber kleinsten Mengen dieser Verbindungen: Dioxine weisen eine hohe chemische und biologische Stabilität auf und sind sehr lipophil. Daher kommt es (auch ohne Unfälle) nach Emission von TCDD aus verschiedenen, vorwiegend industriellen Quellen zu seiner weltweiten Verbreitung in der Umwelt (atmosphärische und aquatische Verteilung) und zu einer Anreicherung in der Nahrungskette. Am Ende dieser Kette finden sich (z.B. bei Eisbären in der Arktis, fernab jeder Zivilisation) besonders hohe Gewebekonzentrationen, und erwartungsgemäß erfährt auch der Mensch eine relativ hohe Anreicherung in Fettkompartimenten (WEBSTER und COMMONER, 1994). Ein Selbstversuch von Poiger (Institut für Toxikologie, Zürich) mit ³H-markiertem TCDD offenbarte Mitte der 80er Jahre erstmals die aus diesen Eigenschaften resultierende lange biologische Halbwertszeit, die beim Menschen mit ca. 7 Jahren besonders lang ist (POIGER und SCHLATTTER, 1986). Dies mobilisierte weitere Ängste bezogen auf eine schleichende allgemeine Vergiftung („chemische Zeitbombe“, „Seveso ist überall“), die für politischen Zündstoff sorgte durch Infragestellung von Müllverbrennungsanlagen oder zunehmender Dichte von Produkten der Chemie-Industrie im Alltag, deren Ökobilanz gar nicht geklärt ist (Stichwort: Polyvinylchlorid, PVC).

Der bereits erwähnte Nachweis von Dioxinen und anderen akkumulierenden Verbindungen in der Muttermilch führte zudem zu Besorgnissen, daß die im Vergleich zur Mutter zu erwartenden höheren Konzentrationen beim lange gestillten Kind (NEUBERT 1988) negative biologische Wirkungen auf den möglicherweise besonders empfindlichen Organismus haben könnten. Damit verband sich die praktische Frage nach der zu empfehlenden Stilldauer, die viele Mütter beschäftigt im Zwiespalt zwischen nachgewiesenen positiven Effekten des Stillens und befürchteten negativen durch die Schadstoffbelastung („vergiften wir unsere Kinder?“).

Was sind Dioxine ?

Zunächst aber zur Frage: was sind eigentlich „Dioxine“? Das trizyklische Grundmolekül besteht aus zwei über Sauerstoffbrücken verbundene Benzolringen. Seitlich bleiben insgesamt acht Positionen, die durch Chloratome substituiert werden können. Beim 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin sind dies die Eckpositionen, die ein besonders planes Molekül entstehen lassen.



Molekularstruktur von 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-*p*-dioxin

Je nach Grad der Chlorierung gibt es Mono-, Di-, Tri-, Tetra-, Penta-, Hexa-, Hepta- und Oktachlordibenzo-*p*-dioxine, für die sich jeweils eine unterschiedliche Zahl von Isomeriemöglichkeiten ergibt. Auf diese Weise sind insgesamt 75 verschiedene Moleküle denkbar, die als polychlorierte Dibenzo-*p*-dioxine (PCDDs, „Dioxine“) bezeichnet werden. Eng verwandt mit dieser Gruppe sind die polychlorierten Dibenzofurane (PCDFs, „Furane“), die als Kernstruktur einen Furanring besitzen, an den die Benzolringe gebunden sind. Wegen der Asymmetrie bestehen hier mehr Möglichkeiten für die Isomerie, so daß insgesamt 135 verschiedenen PCDFs existieren.

Dioxine und Furane wurden nie zu Gebrauchszwecken hergestellt. Mitte der 50er Jahre wurden TCDD und andere Dioxine von Sandermann (Bundesforschungsanstalt für Forst- und Holzwirtschaft, Hamburg) durch Chlorierung von Dibenzo-p-dioxin synthetisiert und beschrieben (SANDERMANN et al, 1957; SANDERMANN 1984). Es handelte sich um eine kristalline, weißliche, nicht flüchtige Verbindung mit einem Schmelzpunkt von 320°C. Nachdem Sandermann die Substanz in einer offenen Kristallisationsschale einige Zeit auf seinem Schreibtisch stehen ließ, offenbarte sich das damals noch nicht erkannte Gefährdungspotential nach einiger Zeit: er und drei seiner Mitarbeiter sowie eine Reinigungskraft entwickelten Chlorakne. An der Universitäts-Hautklinik Hamburg-Eppendorf wurde schließlich von Schulz TCDD als kausales Agens identifiziert und in Zusammenhang mit Chlorakne-Fällen bei Boehringer-Arbeitern gebracht, die in der Trichlorphenol-Produktion beschäftigt waren (KIMMIG und SCHULZ, 1957): TCDD entsteht temperaturabhängig in kleinsten Mengen als Nebenprodukt bei industriellen Prozessen mit Trichlorphenol – sowohl bei dessen Herstellung wie bei dem Seveso-Unfall, wie auch bei der Weiterverarbeitung z.B. zu 2,4,5-Trichlorphenoxyessigsäure (2,4,5-T), einem Herbizid. Diese Substanz war wesentlicher Bestandteil des von der US-Armee im Vietnamkrieg als Entlaubungsmittel eingesetzten „Agent Orange“, und sie führte zur flächenhaften TCDD-Kontamination ganzer Landstriche sowie zur moderaten Exposition nicht nur der Bewohner, sondern auch der beteiligten US-Soldaten („Ranch Hand“ people).

Gemische von Dioxinen und Furanen entstehen als unerwünschte Nebenprodukte in niedrigen Konzentrationen auch bei verschiedenen thermischen Prozessen, an denen Chlor beteiligt ist, so bei der Aluminiumproduktion oder beim Kupferrecycling aus Kabel- und Leiterplatten-Resten, bei dem Kupfer zusätzlich als Katalysator wirkt. Ebenso führt die Chlorbleiche von Papier zur Dioxin-Entstehung, die bis Anfang der 90er Jahre durch die Verwendung von entsprechenden Kaffeefiltern ca. zu einem Viertel der täglichen Exposition Erwachsener in Deutschland beitrug (BECK et al, 1989). Bei Bränden mit chlorhaltigen Materialien (auch: Müllverbrennung) und insbesondere bei Bränden mit polychlorierten Biphenylen (PCBs), die z.B. als Transformatorenöle eingesetzt wurden, konnten in erheblichem Masse Dioxine und Furane entstehen. Diese Verbindungen wurden aber auch bei alltäglichen Verbrennungsprozessen nachgewiesen, so in Autoabgasen oder im Zigarettenrauch. Untersuchungen von Sedimenten oder historischen Proben, die in den letzten Jahren durchgeführt wurden (PÄPKE 1998), legen den Schluß nahe, daß Dioxine größtenteils erst im 20. Jahrhundert mit Entwicklung der Industrialisierung und insbesondere der Chlorindustrie

entstanden sind. Die höchsten Emissionen fanden vermutlich in den 50er und 60er Jahren statt. In den letzten Jahrzehnten konnte durch Umweltschutzmaßnahmen eine deutliche Reduzierung der Einträge erreicht werden konnte.

Probleme bei der Risiko-Abschätzung

Gefragt war spätestens seit dem Seveso-Unfall die wissenschaftlich begründete Beantwortung zahlreicher Fragestellungen, insbesondere die der Risikoabschätzung für den Menschen. Diese erwies sich im Lauf der Jahre jedoch als ungewöhnlich schwierig. Folgende Aspekte sind dabei bedeutend:

- im Vergleich zu vielen anderen toxischen Substanzen ist der Erkenntnisgewinn aus Tierversuchen in Bezug auf die Übertragbarkeit auf den Menschen besonders gering: die Wirkung von TCDD ist stark Spezies- und sogar Stamm-abhängig. So läßt sich die beim Menschen zu beobachtende Chlorakne nur bei Affen und einem speziellen Mäusestamm („hairless mouse“) beobachten, andererseits wurden viele im Tierversuch beobachtbare Effekte bisher bei hoch TCDD-belasteten Menschen nicht gesehen. Viele Wirkungen lassen sich im Tierversuch nur bei bestimmten Spezies auslösen, während andere diese Effekte nicht zeigen. Für die letale Dosis, bei der 50% der behandelten Tiere sterben (LD_{50}), gibt es eine große Spanne zwischen den besonders empfindlichen Meerschweinchen (LD_{50} ca. 0,5 µg/kg Körpergewicht) und den besonders unempfindlichen Hamstern (LD_{50} ca. 1000 µg/kg Körpergewicht), ohne daß die Ursache für diese extremen Differenzen bisher aufgeklärt worden wäre. Zudem ist die Halbwertszeit von TCDD ungewöhnlich unterschiedlich zwischen Nagetieren (wenige Wochen), Affen (mehrere Wochen bis Monate) und Menschen, die wie erwähnt mit ca. 7 Jahren die längste beobachtete Halbwertszeit haben (VAN DEN BERG et al, 1994). Sowohl aus dynamischen als auch aus kinetischen Gründen gibt es somit kein Tiermodell, das auch nur annähernd für den Menschen gültige experimentelle Ergebnisse liefern könnte.

- der Wirkmechanismus von TCDD ist nur teilweise geklärt. Zwar wurde Anfang der 80er Jahre der zytoplasmatische Ah-Rezeptor (Aryl hydrocarbon-Rezeptor, „Dioxin-Rezeptor“) entdeckt, an den sich das Molekül aufgrund seiner planaren Struktur mit hoher Affinität bindet und so eine Kaskade von intrazellulären Veränderungen auslöst, die in den vergangenen beiden Jahrzehnten auf molekularer Ebene aufgeklärt wurden: der TCDD/Ah-Rezeptor-Komplex bewirkt schließlich im Zellkern die Transkription mit Bildung von m-

RNA, die zur de-novo-Synthese von Proteinen führt (z.B. Cytochrom P450 1A-Induktion mit klassischer S-förmiger Dosis-Wirkungs-Kurve bei Nagetieren). Durch diesen Mechanismus sind hormonähnliche Wirkungen bei bereits geringen Konzentrationen erklärbar. TCDD ist daher eine Modellsubstanz für Ah-Rezeptor vermittelte Wirkungen, und eine unterschiedliche genetische Ausstattung mit dem Rezeptor könnte Spezies- und Organ-differente Wirkungen erklären. Andere Dioxine und Furane binden aufgrund ihrer weniger gut passenden Molekülstruktur mit geringerer Affinität an den Rezeptor und lösen so entsprechend weniger Wirkung aus (sind also auch weniger toxisch). Dabei haben allerdings nur die mindestens in den Positionen 2, 3, 7 und 8 substituierten Verbindungen eine Affinität zum Ah-Rezeptor. Es bleiben jedoch viele Fragen, u.a. warum Säugetiere einen intrazellulären Rezeptor haben, der phylogenetisch offensichtlich wichtig war, dessen physiologischer Ligand und somit dessen physiologische Bedeutung aber unklar bleiben. Und es bleibt die Frage, warum TCDD mit höchster Affinität bindet – eine Substanz, die vermutlich erst im Rahmen der industriellen Entwicklung des 20. Jahrhunderts in größeren Mengen auf der Erde entstanden ist. Unklar bleibt ebenfalls, ob Ah-Rezeptor vermittelte Wirkungen neben der Cytochrom-P450 1A Induktion auch für andere, im Tierexperiment zu beobachtende Effekte verantwortlich sind. Für immunologische Wirkungen scheint dies so zu sein, es fällt jedoch auf, daß es bei verschiedenen Spezies kein einheitliches Muster der immunologischen Veränderungen gibt, sowohl stimulierende als auch supprimierende Effekte wurden beobachtet (KERVLIET 1994, NEUBERT 1997/98). Weitere ungeklärte Fragen betreffen die Ursachen des Wasting-Syndrom (an dem akut mit hohen Dosen behandelte Tieren nach frühestens einigen Tagen sterben), die mögliche Kanzerogenität von TCDD, sowie die Mechanismen, die zur Chlorakne führen.

- die toxikologische Relevanz von TCDD für den Menschen muß deshalb in erster Linie aus Einzelbeobachtungen oder besser epidemiologischen Untersuchungen abgeleitet werden, die jedoch in aussagekräftiger Form nur begrenzt vorliegen. Dies ist zunächst dem Umstand zuzuschreiben, daß nur wenige größere Unfälle aufgetreten sind. Schon in den 50er Jahren kam es bei Chemie-Arbeitern (Boehringer, BASF) zu Chlorakne-Fällen, die aufgrund der wesentlich später durchgeführten Blutanalysen sehr wahrscheinlich TCDD-bedingt waren (z.B. ZÖBER und PÄPKE, 1993). Doch die gleichzeitige Co-Exposition gegenüber weiteren Verbindungen (in meist wesentlich höheren Konzentrationen), wie sie typisch für Chemiarbeiter ist, erschwert eine eindeutige Interpretation der Ursache von z.B. erhöhten Krebs-Inzidenzen. Bei dem erwähnten Unfall in Seveso konnte diese Co-Exposition weitgehend ausgeschlossen werden. Aber obwohl hier eine relativ große Zahl von Menschen

involviert war, in vorbildlicher Weise Untersuchungsprogramme initiiert wurden und die Asservierung von tiefgefrorenen Blutproben ab Ende der 80er Jahre nachträgliche TCDD-Analysen ermöglichten, war die Interpretation der Daten schwierig. Für eine eindeutige Beantwortung der Frage der Kanzerogenität (BERTAZZI et al, 1998, 2001; NEUBERT 1997/98) war selbst hier die Fallzahl zu gering, zumal die Analysen zeigten, daß nur eine relativ kleine Zahl von Personen hoch TCDD-exponiert wurde (Median-Wert bei 296 Untersuchten der Zone A: ca. 450 pg/g, maximaler Wert bei Erwachsenen: 10 000 pg/g, bei Kindern: 56 000 pg/g Blutfett; 22 Proben lagen unterhalb der Nachweisgrenze: NEEDHAM et al, 1997/98). Diese Werte belegen die individuell stark unterschiedliche TCDD-Exposition und machen deutlich, daß die früher oft benutzte Einteilung in die Zonen A, B und R weniger sinnvoll ist, und so eventuelle Effekte eher „verwischt“ werden. Untersuchungen anderer Kollektive krankten häufig nicht nur an einer zu kleinen Fallzahl, sondern auch an der individuell nicht oder nicht gut dokumentierten Exposition (incl. der erwähnten Co-Exposition gegenüber anderen Verbindungen) sowie an mangelnder Berücksichtigung von Confoundern wie Alter, Vorerkrankungen und Zigarettenrauchen (NEUBERT 1997/98).

- Der analytische Nachweis ist aufwendig und teuer. Bei den Analysen von biologischen Proben erfolgt nach Fettextraktion und Aufreinigung die Messung mit einer Kombination aus gaschromatographischer Auftrennung und massenspektrometrischer Quantifizierung (HRGC/HRMS, HR = high resolution), nachdem vor der Aufarbeitung ¹³C-markierte Standards zugesetzt wurden. Während bei den ersten Blutanalysen Ende der 80er Jahre noch Blutmengen von bis zu 500 ml benötigt wurden, konnte diese Menge in den letzten Jahren auf wenige ml reduziert werden, um die im pg/g-Bereich (= ppt, parts per trillion, = 10⁻¹² g/g) liegenden Konzentrationen nachzuweisen. Geblieben sind jedoch hohe Kosten von 500 bis 1000 € pro Bestimmung. Die gemessenen Mengen werden auf das in der Probe enthaltene Fett bezogen, da die lipophilen Substanzen sich vorwiegend passiv im Körper verteilen entsprechend dem jeweiligen Fettgehalt. Die auf Fett bezogenen Konzentrationen sind in einem Organismus ungefähr gleich hoch (z.B. in Blut, Muttermilch und Fettgewebe). Im Gegensatz zu vielen relativ flüchtigen Substanzen sind Dioxine und verwandten Substanzen aufgrund ihrer Persistenz auch noch viele Jahre nach einer akuten Exposition nachzuweisen.

- Neben Dioxinen und Furanen gibt es eine Reihe von weiteren akkumulierenden Verbindungen, die zur chronischen Exposition des Menschen durch ein komplexes Gemisch führen. Dieses Gemisch ist toxikologisch kaum zu bewerten – nicht nur aufgrund der Vielzahl von Einzelsubstanzen, sondern auch aufgrund möglicher Kombinationswirkungen. Für die 75

Dioxine und 135 Furane stellt sich die Situation noch relativ übersichtlich dar, weil nur die 17 mindestens in den Positionen 2, 3, 7 und 8 substituierten Verbindungen im Säugetierorganismus akkumulieren (die Ursache hierfür ist unbekannt). Unter der Annahme additiver, Ah-Rezeptor vermittelter Wirkungen läßt sich für jede Verbindung ein Faktor (TEF, Toxicity Equivalency Factor) zwischen 0 und 1 ermitteln, der die jeweilige Affinität zum Rezeptor und so das Wirkpotential relativ zu dem von TCDD beschreibt (TCDD: TEF = 1; niedrigster Wert für Oktachlordibenzo-p-dioxin mit einem TEF von 0,0001). So kann durch Multiplikation der jeweiligen Konzentration mit dem TEF für jede Verbindung diejenige TCDD-Konzentration berechnet werden, die die gleiche Wirkung hätte. Unter der Voraussetzung additiver Wirkungen dürfen diese Konzentrationen bei einem Gemisch dann zusammengerechnet werden zu einem Gesamt-Toxizitäts-Äquivalent (TEQ); d.h. das Wirkpotential einer Mischung von Dioxinen und Furanen kann durch eine einzige, nur TCDD entsprechende Konzentration beschrieben werden. Komplexer wird es dadurch, daß neben Chlor auch andere Halogene substituieren können (bekannt sind insbesondere bromierte Verbindungen), und daß es eine nahezu unbegrenzte Zahl von möglichen Mischsubstitutionen gibt.

Noch komplizierter wird die Situation durch die in sich schon sehr heterogene Gruppe der 209 polychlorierten Biphenyle (PCBs), die auch Verbindungen mit mehr oder weniger stark Dioxin-ähnlichem Wirkpotential beinhaltet. Da jedoch andere PCBs ein für den Ah-Rezeptor antagonistisches Potential besitzen, bleibt die häufig angewandte Ausweitung des TEF-Konzeptes auf PCBs wissenschaftlich fragwürdig. Zudem haben die in Humanproben in den höchsten Konzentrationen vorliegenden PCBs keine Affinität zum Ah-Rezeptor (Nr. 138, 153 und 180 stellen ca. 60 % der Gesamtmenge, deren Spiegel mehr als 10 000 mal höher liegt als der von TCDD). Gleiches gilt für eine Reihe weiterer Verbindungen, die ebenfalls persistent und lipophil sind und in der Nahrungskette akkumulieren. Hierzu gehören die z.T. schon seit Jahren verbotenen Insektizide bzw. deren Abbauprodukte, die im Hintergrundbereich immer noch mit hohen Konzentrationen gemessen werden können: DDE als Hauptmetabolit von DDT, Hexachlorbenzol (HCB, auch Verbrennungsprodukt) oder β -Hexachlorcyclohexan (β -HCH) als langlebige Komponente von Lindan (γ -HCH). In den letzten Jahren haben die früher ebenfalls als Insektizide verwendeten Toxaphene und die polybromierten Diphenylether, die als Flammenschutzmittel eingesetzt werden, verstärkt Aufmerksamkeit bekommen. Für alle in diesem Absatz genannten Verbindungen hat sich aufgrund ihrer

gemeinsamen Eigenschaften in den letzten Jahren ein neuer Begriff durchgesetzt: Persistent Organic Pollutants (POPs).

Eigene Forschungsarbeiten

Eigene Forschungsarbeiten zu dem umrissenen Themenkomplex wurden vom Autor zunächst am Institut für Toxikologie und Embryopharmakologie (Direktor: Prof. Dr. D. Neubert) durchgeführt:

- Untersuchungen zur Kinetik und Induktion des hepatischen Cytochrom-P450 Systems durch TCDD in der Ratte, bei der die dosisabhängige Verteilung der Substanz auf Leber- und Fettgewebe erstmals dokumentiert werden konnte (ABRAHAM et al., 1988).
- Untersuchungen zur Vehikel-Optimierung der subkutanen TCDD-Applikation bei der Ratte (ABRAHAM et al., 1989a).
- Vergleichende Untersuchungen zur Gewebeverteilung (Leber/Fettgewebe) von als Gemisch applizierten PCDDs und PCDFs bei Ratten und Marmoset-Affen (ABRAHAM et al., 1989b).
- Untersuchungen zur fäkalen Ausscheidungen von PCDDs und PCDFs nach parenteraler Applikation (ABRAHAM et al., 1989c).
- Untersuchungen zur Gewebeverteilung von als Gemisch applizierten PCDDs und PCDFs bei Ratten. (ABRAHAM et al., 1989d).
- Untersuchungen zur Gewebeverteilung von als Gemisch applizierten PCDDs und PCDFs bei Marmoset-Affen. (ABRAHAM et al., 1990).

In der Kinderklinik (Kaiserin Auguste Victoria Haus, Direktor: Prof. Dr. H. Helge) folgten Forschungsarbeiten zur Problematik der Akkumulation von PCDDs, PCDFs und PCBs bei gestillten Säuglingen:

- Bilanzuntersuchungen (Aufnahme/Ausscheidung) mit der Frage der Resorptionsraten, bei denen sich zeigte, daß die toxikologisch relevanten Verbindungen weitgehend vollständig aufgenommen werden (ABRAHAM et al., 1994)

- Weiterführende Untersuchungen, bei denen zusätzlich erstmals für Dioxine und Furane die Blutgehalte am Ende des ersten Lebensjahres untersucht und mit denen der Mütter verglichen werden konnten. Die theoretisch erwartete Akkumulation konnte bestätigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, daß die Konzentrationen im Stuhlfett weitgehend von denen im Körperfett bestimmt werden (und nicht von den aktuell im Nahrungsfett vorhandenen), vermutlich bedingt durch einen Ausgleich während der Passage über die Darmbarriere hinweg. Dies erklärt auch die mögliche Elimination von Dioxinen und verwandten Verbindungen durch nicht resorbierbare, unverdauliche Fette wie Olestra (ABRAHAM et al., 1996).
- Untersuchungen bei gestillten Geschwistern, bei denen die theoretisch erwartete Verringerung der Konzentrationen von Kind zu Kind und die kurze Halbwertszeit bei der Mutter dokumentiert werden konnten (ABRAHAM et al., 1998).

Den Mittelpunkt dieser Habilitationsschrift bilden zwei Projekte, die vom Forschungszentrum Karlsruhe finanziert und während meiner Zeit an der inzwischen ins Virchow-Klinikum umgezogenen Kinderklinik durchgeführt wurden (Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und Immunologie, Direktor: Prof. Dr. U. Wahn):

Projekt 1: Belastung von Säuglingen mit polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen (PCDDs), Dibenzofuranen (PCDFs) und Biphenylen (PCBs) und deren Auswirkung auf sensible biologische Parameter (PUG U 96 005)

Als mögliche Risikogruppe bezüglich der Exposition gegenüber persistenten organischen Verbindungen aus der Umwelt sind gestillte Säuglinge anzusehen: nach Stillzeiten von mehreren Monaten übersteigen die gemessenen Konzentrationen im Blutfett der Kinder diejenigen ihrer Mütter (ABRAHAM et al. 1996, 1998). Nach dem Abstillen ist zwar durch das rasante Körperwachstum mit einem raschen Abfallen der Konzentrationen zu rechnen, jedoch stellen die im ersten Lebensjahr erreichten Spitzenwerte für lange Zeit die höchsten Werte dar (die das Kind u.U. erst mehrere Jahrzehnte später wieder erreichen wird). In dieser frühen Lebensphase finden jedoch zahlreiche Entwicklungsprozesse statt, die möglicherweise besonders empfindlich für Störungen sind. Sollten diese tatsächlich erfolgen, wären große Wirkungen auf das spätere Leben des Kindes möglich.

Sollte sich bei gestillten Kindern durch entsprechende Studien ein Einfluß von Dioxinen und verwandten Verbindungen (bei Konzentrationen im Hintergrundbereich) auf biologische

Parameter bei gestillten Säuglingen belegen lassen, so wäre eine damit begründete Einschränkung der Stillempfehlung gegen die zahlreichen Vorteile des Stillens abzuwägen. Tatsächlich wurden in den vergangenen Jahren in verschiedenen Ländern Studien bei Säuglingen durchgeführt, bei denen biologische Parameter (insbesondere Immunologie, Schilddrüsenhormone) gemessen und Assoziationen mit Konzentrationen von Dioxinen oder verwandten Verbindungen publiziert wurden (Details siehe Projektbericht). Zusammenfassend läßt sich über diese Arbeiten sagen, daß es keine konsistenten Befunde gab, die gemessenen Werte innerhalb des Normalbereichs lagen, und einigen Arbeiten Zweifel an der wissenschaftlichen Sorgfalt aufkommen ließen.

Eine neue Studie erschien daher notwendig, mit der zuverlässiger als mit den bisher durchgeführten Studien eine Antwort auf die Frage gegeben werden sollte, ob und gegebenenfalls oberhalb welcher Konzentration durch die postnatale Exposition von gestillten Säuglingen mit PCDDs, PCDFs und PCBs Veränderungen von sensiblen biologischen Parametern auftreten. Dabei sollte insbesondere auf die Kontrolle der zahlreichen Confounder Wert gelegt werden. Die Bedeutung der Ergebnisse würde in erster Linie darin liegen, auf dieser Basis eine besser begründete Stillempfehlung geben zu können. Als untergeordnete Frage ging es zudem um die genauere Beschreibung der kindlichen Konzentrationen von Dioxinen und verwandten Verbindungen in Abhängigkeit von den mütterlichen Konzentrationen und der Stilldauer. Dies wurde durch eine Fortentwicklung der analytischen Methoden zur Dioxin-Bestimmung möglich, die eine Messung aus dem geringen Probenmaterial zuläßt, daß beim Kind zur Verfügung steht.

Projekt 2: Veränderungen biologischer Parameter (Immunsystem, Cytochrom P450-System) bei 3 hoch 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)-exponierten Personen aus Wien (BWB 20002)

Angeichts der oben geschilderten Problematik der sehr begrenzten Übertragbarkeit von tierexperimentellen Erkenntnissen auf den Menschen ist die Untersuchung von Personen, die durch Unfälle stärker gegenüber Dioxinen oder verwandten Substanzen exponiert wurden, von besonderer Bedeutung. In Wien wurden Ende 1997 mehrere Mitarbeiter eines Textilforschungsinstituts auf bisher unbekannte Weise mit TCDD belastet. Zwei Frauen entwickelten eine Chlorakne; bei ihnen wurden die höchsten jemals gemessenen Konzentrationen im Blutfett festgestellt (144 000 bzw. 26 000 pg/g Blutfett). Klinisch

unauffällig blieb ein Mann, bei dem mit 856 pg/g die dritthöchste Exposition in diesem Betrieb festgestellt wurde (Hintergrundbereich ca. 1-2 pg/g Blutfett).

Die beiden Frauen werden weiterhin an der Immundermatologischen Abteilung der Universität Wien (Leiter: Prof. Dr. G. Stingl) betreut und stimmten einem umfangreichen Untersuchungsprogramm zu. Außer der Chlorakne und initialen gastroenterologischen Problemen (Übelkeit, leichte Gewichtsabnahme) konnten weder andere gravierende klinischen Probleme noch Veränderungen von Laborparametern festgestellt werden, die eindeutig auf die TCDD-Exposition zurückzuführen waren (GEUSAU et al, 2001)

Im Rahmen meines Forschungsprojektes wurden zusätzliche Untersuchungen bei den erwähnten 3 Personen durchgeführt, die nur bei gleichzeitiger Untersuchung eines geeigneten Kontrollkollektivs aussagekräftige Ergebnisse erwarten ließen:

- Eine umfangreiche Untersuchung des Immunsystems, bei dem auch moderne Verfahren zur Anwendung kamen, für die keine Referenzwerte vorliegen (z.B. weil sie abhängig sind von den eingesetzten Methoden oder Chargen).
- Die Untersuchung der Cytochrom-P450 1A2 Aktivität in der Leber, die mit dem Koffeintest gemessen wurde. Es sollte die Frage geklärt werden, ob bzw. in welchem Ausmaß dieses Enzymsystem beim Menschen durch TCDD induzierbar ist. Entsprechende Resultate waren zwar – wie oben beschrieben – nach tierexperimentellen Untersuchungen zu erwarten, konnten aber bisher bei verschiedenen Populationen nicht eindeutig gezeigt werden. Die Demethylierung des Koffeins wurde dabei mit verschiedenen Methoden erfaßt, so daß hiermit auch Aussagen bezüglich der Optimierung solcher Tests zu erwarten waren.

Die Ergebnisse wurden mit denen einer parallel in Berlin untersuchten Gruppe von gesunden Kontrollpersonen verglichen, die aus Nichtrauchern und starken Rauchern bestand. Auf diese Weise sollten mögliche TCDD-Effekte mit denen der Zigarettenrauch-Exposition verglichen werden. Zudem erlaubte bei der Untersuchung der Cytochrom-P450 1A2 Aktivität die Einbeziehung von Rauchern eine Qualitätskontrolle (Bestätigung bekannter Effekte durch Zigarettenrauch).

Zusammenfassung der Projektergebnisse

Projekt 1

Zwischen Juni 1997 und Mai 1999 wurden insgesamt 101 gesunde Kinder im Alter von 11 Monaten untersucht, von denen 80 mindestens 4 Monate lang voll gestillt waren (durchschnittliche äquivalente Vollstilldauer: 7,4 Monate). 21 Kinder waren nicht gestillt worden (= weniger als 2 Wochen gestillt). Von den gestillten Kindern kamen 27 aus der Region Ilseburg/Harz (z.T. mit höherer PCDD/PCDF-Exposition durch die dort bis 1990 betriebene Kupferhütte). Entsprechend dem Studienkonzept mußten die Kinder bzw. ihre Eltern weitere Auswahlkriterien erfüllen (normale Entwicklung der Kinder, akut keine Infekte, keine Exposition gegenüber Zigarettenrauch, Eltern aus dem deutschsprachigen Raum).

Es erfolgte eine Blutentnahme morgens früh in der Wohnung. Um Schreien des Kindes zu vermeiden, wurde auf die Entnahmestelle auf dem Handrücken zuvor eine anästhesierende Creme (Emla®) aufgetragen, zudem durfte das Kind gleichzeitig seine Milchflasche trinken. Auf diese Weise waren bei der Blutentnahme 58 Kinder ganz ruhig, 30 Kinder waren zeitweise unruhig; bei 13 Kindern konnte ein längeres Schreien nicht vermieden werden. Dieser Unruhezustand machte sich bereits innerhalb von Minuten in erhöhten Leukozytenzahlen (Streßleukozytose) bemerkbar. Bei 36 Kindern wurde zudem eine 2. Blutentnahme zur Kontrolle einzelner auffälliger Werte durchgeführt, bei der die biologischen Parameter noch einmal gemessen wurden. Hierdurch konnten für gesunde einjährige Kinder Daten über die biologische Variation dieser Parameter innerhalb eines kurzen Zeitraums (durchschnittlich 4 Wochen) gewonnen werden, die für die Interpretation möglicher Effekte wichtig waren.

Mit dem entnommenen Blut konnte ein umfangreiches Untersuchungsprogramm durchgeführt werden (insbesondere klinische Chemie, Immunologie, Schilddrüsenfunktion). Schwermetalle (Blei, Kadmium, Quecksilber) wurden aus Vollblut gemessen (möglicher Confounder). Die Exposition gegenüber Dioxinen und verwandten Verbindungen konnte erstmals im Rahmen einer solchen Studie direkt im Plasma gemessen werden (parallele Bestimmung bei der Mutter). Für die Dioxin-Toxizitätsäquivalente (I-TEq) lagen die Werte bei den nicht gestillten Kindern durchschnittlich bei 2,4 pg/g Blutfett, bei den gestillten Kindern bei 25,3 pg/g Blutfett (Maximum 107 pg/g Blutfett).

Durch die parallele Untersuchung der Dioxin-Konzentrationen bei Mutter und Kind konnte erstmals für eine größere Gruppe die Akkumulation der Verbindungen während der Stillperiode erfaßt werden. Der theoretisch erwartete, von der Stilldauer abhängige Akkumulations-Effekt ließ sich eindrucksvoll bestätigen. Der Quotient der jeweiligen Konzentrationen (Kind/Mutter) 11 Monate nach der Geburt zeigte eine lineare Abhängigkeit der logarithmierten Werte von der äquivalenten Vollstilldauer mit bemerkenswert hoher Korrelation. Allgemein war die Akkumulation niedrig chlorierter Verbindungen stärker als die der höher chlorierten.

Die Frage möglicherweise auftretender Effekte auf biologische Parameter als Folge der Exposition gegenüber Dioxinen und verwandten Verbindungen wurde zunächst durch bivariate Korrelationsanalysen (Spearman) untersucht. Bei den 93 Parametern, bei denen die statistischen Prüfungen jeweils für 6 Verbindungen bzw. Verbindungsgruppen vorgenommenen wurden, fanden sich insgesamt 25 signifikante Assoziationen ($p < 0,05\%$). Diese Zahl lag grob im Rahmen der Erwartungen, die sich allein aufgrund des Zufalls bei unabhängigen Parametern ergeben hätte. Bei der multivariaten Analyse der beobachteten signifikanten Assoziationen zeigte sich in vielen Fällen, daß bei Einbeziehung weiterer Faktoren keine Signifikanz mehr hinsichtlich der betrachteten persistenten organischen Verbindungen bestand. Ein Einfluß von Dioxinen auf Parameter wie Thyroid-stimulierendes Hormon (TSH) oder die Lymphozyten-CD4/CD8-Ratio, wie z.T. von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, konnte nicht bestätigt werden.

Vor dem Hintergrund der nachgewiesenen positiven Effekte des Stillens fiel daher die Entscheidung leicht, die bestehende Stillempfehlung zu bekräftigen. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund der in Deutschland weiter absinkenden Konzentrationen von Dioxinen und verwandten Verbindungen in der Muttermilch. Wie in dieser Empfehlung vorgesehen, sollte aus ernährungsphysiologischen Gründen nach 4 bis 6 Monaten mit der Einführung von Beikost begonnen werden.

Projekt 2

Im Rahmen dieses Projektes wurden 3 TCDD-Exponierte aus Wien (initiale Werte bei Person 1, 2 und 3: 144 000, 26 000 bzw. 856 pg/g Blutfett) genauer untersucht hinsichtlich der Veränderungen des Immunsystems (weißes Blutbild, Granulozyten-Funktion, Lymphozyten-Proliferation und Zytokin-Produktion nach Stimulation mit Mitogenen und Antigenen, Lymphozyten-Subpopulationen, Antikörper-Produktion) und der Cytochrom-P450 1A2 Induktion (Koffein-Metabolismus, gemessen als ^{13}C -Atemtest, Konzentrationsabfall im Serum, Metaboliten-Bildung im Serum und Urin). Zum Vergleich wurde eine altersentsprechende Kontrollgruppe (n=50, davon 30 Nichtraucher und 20 starke Raucher) untersucht. Bei der Untersuchung im Oktober 2000 betrugen die aktuell im Blutfett von den Personen 1, 2 und 3 gemessenen TCDD-Konzentrationen 30 300, 10 100 bzw. 420 pg/g Blutfett.

Insgesamt zeigte die umfangreiche Untersuchung wesentlicher Teile des Immunsystems trotz der extremen TCDD-Exposition bei Person 1 und 2 keine eindeutigen Auffälligkeiten, die auf diese Exposition zurückgeführt werden könnten. Bei Einbeziehung von Voruntersuchungen und von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen sind möglicherweise die relativ hohe Lymphozytenzahl im peripheren Blut, der relativ niedrige prozentuale Nk-Zell-Anteil bei den Lymphozyten und die erhöhte Lymphozyten-Proliferation nach Mitogen- und Candida-Stimulation als TCDD-Effekte anzusehen. Diese Veränderungen waren jedoch nicht gravierend und lagen im Fall der Candida-Stimulation innerhalb des „Normalbereichs“ von Rauchern. Die beobachteten leichten Veränderungen haben sehr wahrscheinlich keine klinische Relevanz, wie auch die bisherige Nachbeobachtung der TCDD-exponierten Personen keinen Anhalt für eine Beeinträchtigung ihres Immunsystems bot. Es bestätigte sich somit erneut, daß beim Menschen immunologische Parameter sicherlich nicht als empfindliche Biomarker einer TCDD-Exposition angesehen werden können. Für den Hintergrundbereich (TCDD kleiner 2 pg/g Blutfett) kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Wirkung der Dioxin-Exposition (einschließlich anderer Organochlor-Verbindungen mit Affinität zum Ah-Rezeptor) auf das Immunsystem des Erwachsenen ausgeschlossen werden. Grundsätzlich ist dieses sehr wohl empfindlich bezüglich der Einwirkung von Fremdstoffen: von den ausgewerteten 164 Parametern zeigten 34 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der Nichtraucher und der Raucher.

Die Cytochrom-P450 1A2 Aktivität der Leber konnte zuverlässig und mit guter Reproduzierbarkeit durch mehrere Methoden als Koffein-Demethylierungsrate gemessen werden. Lediglich zwei untersuchte Urin-Metaboliten-Ratios mit Koffein im Nenner zeigten sich als unbrauchbar, wahrscheinlich bedingt durch die Abhängigkeit der Werte vom Urinfluß. Bei den hoch TCDD-belasteten Personen 1 und 2 konnte eine ca. 10-fache Induktion nachgewiesen werden (im Vergleich zu ebenfalls nichtrauchenden Menschen; Raucher hatten bei den verschiedenen untersuchten Parametern durchschnittlich zwischen 1,4 und 1,8-fach höhere Werte als Nichtraucher). Die Einbeziehung der seit Dezember 1998 bei Person 1 und 2 mehrfach durchgeführten Voruntersuchungen zeigte, daß trotz mit der Zeit fallender TCDD-Werte die Induktion relativ konstant blieb und in diesem Konzentrationsbereich vermutlich einem Maximum auf einem Plateau entspricht. Weniger eindeutig waren die Ergebnisse der moderat exponierten Person 3, bei der sich reproduzierbar nur für zwei der verwendeten Methoden (kumulative ^{13}C -Exhalation im Atemtest und eine Urin-Metaboliten-Ratio) eine Induktion im Vergleich zu Nichtrauchern nachweisen ließ. Möglicherweise liegt bei dieser Person eine Abweichung von üblichen Metabolisierungswegen vor. Die Annahme einer im Bereich von 1000 pg TCDD/g Blutfett individuell noch nicht sicher nachweisbaren Induktion wäre vereinbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Unter der Annahme, daß neben der Cytochrom-P450 Induktion auch weitere nur im Tierexperiment zu beobachtende TCDD-Effekte Ah-Rezeptor-vermittelt sind und so Wirkungen im extrem niedrigen Konzentrationsbereich erklären, würde eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Menschen dessen relative TCDD-Unempfindlichkeit erklären.

Bemerkenswert bleibt somit weiterhin, daß nach Literaturangaben bei empfindlichen Menschen schon TCDD-Konzentrationen um 1000 pg/g im Blutfett klinische Symptome in Form von Chloasma auslösen können, während bisher kein Biomarker entdeckt worden ist, der in diesem Konzentrationsbereich eine TCDD-Exposition individuell sicher erkennen könnte. Somit kann für den Hintergrundbereich des Erwachsenen mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden, daß TCDD eine relevante Wirkung auf immunologische Parameter oder auf die hepatische Cytochrom-P450 1A2 Aktivität hat. Dies gilt auch bei Einbeziehung verwandter Substanzen mit Affinität zum Ah-Rezeptor.

Literatur

- ABRAHAM K, KROWKE R, NEUBERT D (1988) Pharmacokinetics and biological activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: 1. Dose-dependent tissue distribution and induction of hepatic ethoxyresorufin O-deethylase in rats following a single injection. *Arch Toxicol* **62**:359-368
- ABRAHAM K, KROWKE R, NEUBERT D (1989a) Absorption of TCDD following parenteral application in rats using various vehicles. *Chemosphere* **19**: 893-898
- ABRAHAM K, WEBERRUß U, WIESMÜLLER T, HAGENMAIER H, KROWKE R, NEUBERT D (1989b) Comparative studies on absorption and distribution in the liver and adipose tissue of PCDDs and PCDFs in rats and marmoset monkeys. *Chemosphere* **19**: 887-892
- ABRAHAM K, WIESMÜLLER T, BRUNNER H, KROWKE R, HAGENMAIER H, NEUBERT D (1989c) Elimination of various polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) in rat faeces. *Arch Toxicol* **63**: 75-78
- ABRAHAM K, WIESMÜLLER T, BRUNNER H, KROWKE K, HAGENMAIER H, NEUBERT D (1989d) Absorption and tissue distribution of various polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans (PCDDs and PCDFs) in the rat. *Arch Toxicol* **63**: 193-202
- ABRAHAM K, WIESMÜLLER T, HAGENMAIER H, NEUBERT D (1990) Distribution of PCDDs and PCDFs in various tissues of marmoset monkeys. *Chemosphere* **20**: 1071-1078
- ABRAHAM K, HILLE A, ENDE M, HELGE H (1994) Intake and fecal excretion of PCDDs, PCDFs, HCB and PCBs (138, 153, 180) in a breast-fed and a formula-fed infant. *Chemosphere* **29**: 2279-2286
- ABRAHAM K, KNOLL A, ENDE M, PÄPKE O, HELGE H (1996) Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* **40**:671-679

- ABRAHAM K, PÄPKE O, GROSS A, KORDONOURI O, WIEGAND S, WAHN U, HELGE H (1998) Time course of PCDD/PCDF/PCB concentrations in breast-feeding mothers and their infants. *Chemosphere* **37**:1731-1741
- BECK H, DROß A, ECKART K, MATHAR W, WITTKOWSKI R (1989) PCDDs, PCDFs and related in paper products. *Chemosphere* **19**:655-660
- BERTAZZI PA, BERNUCCI I, BRAMBILLA G, CONSONNI D, PESATORI AC (1998) The Seveso studies on early and long-term effects of Dioxin exposure: a review. *Environ Health Perspect* **106**:626-633
- BERTAZZI PA, CONSONNI D, BACHETTI S, RUBAGOTTI M, BACCARELLI A, ZOCCHETTI C, PESATORI AC (2001) Health effects of dioxin exposure: a 20-year mortality study. *Am J Epidemiol* **153**:1045-1047
- FARA GM (1999) The ICMESA accident. First intervention for the protection of man and environment. In: Chemistry, man and environment. The Seveso accident 20 years on: monitoring epidemiology and remediation (Ballarin-Denti A, Bertazzi PA, Facchetti S, Fanelli R, Mocarelli P, eds) Elsevier, Amsterdam, pp 3-16
- GEUSAU A, ABRAHAM K, GEISLER K, SATOR MO, STINGL G, TSCHACHLER E (2001) Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect* **109**:865-869
- HERXHEIMER K (1899) Ueber Chlorakne. *MMW* **46**:278
- KERKVLiet NI (1994) Immunotoxicology of dioxins and related chemicals. In: Dioxins and health (Schechter A, ed) Plenum Press, New York, pp 199-225
- KIMMIG J, SCHULZ KH (1957) Berufliche Akne (sog. Chlorakne) durch chlorierte aromatische zyklische Aether. *Dermatologica* **115**:540-546
- MOCARELLI P, GERTHOUS PM, BRAMBILLA P, MAROCCHI A, BERETTA C, BERTONA M, CAZZANIGA M, COLOMBO L, CRESPI C, FERRARI E, LIMONTA G, SARTO C, SIGNOTINI S, TRAMACERE PL (1999) Dioxin health effects on humans twenty years after Seveso: a summary. In: Chemistry, man and environment. The Seveso accident 20 years on: monitoring epidemiology and

- remediation (Ballarin-Denti A, Bertazzi PA, Facchetti S, Fanelli R, Mocarelli P, eds) Elsevier, Amsterdam, pp 41-51
- NEEDHAM LL, GERTHOUS PM, PATTERSON DG, BRAMBILLA P, TURNER WE, BERETTA C, PIRKLE JL, COLOMBO L, SAMPSON EJ, TRAMACERE PL, SIGNORINI S, MEAZZA L, CARRERI V, JACKSON RJ, MOCARELLI P (1997/98) Serum dioxin levels in seveso, Italy, population in 1976. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* **17**:225-240
- NEUBERT D (1988) Significance of pharmacokinetic variables in reproductive and developmental toxicity. *Xenobiotica* **18**, Suppl 1:45-58
- NEUBERT D (1997/98) Reflections on the assessment of the toxicity of 'dioxins' for humans, using data from experimental and epidemiological studies. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* **17**:157-215
- PÄPKE O (1998) Humanproben. In: *Handbuch Dioxine* (Oehme M, ed) Spektrum, Heidelberg, pp 267-328
- POIGER H, SCHLATTER C (1986) Pharmacokinetics of 2,3,7,8-TCDD in man. *Chemosphere* **15**:1489-1494
- SANDERMANN W, STOCKMANN H, CASTEN R (1957) Über die Pyrolyse des Pentachlorphenols. *Chem Ber* **90**:690-692
- SANDERMANN W (1984) Dioxin – Die Entdeckungsgeschichte des 2,3,7,8-Tetrachordibenzo-p-dioxins (TCDD, Dioxin, Sevesogift). *Naturwissenschaftliche Rundschau* **37**:173-178
- SIGNORINI S, GERTHOUS PM, DASSI C, CAZZANIGA M, BRAMBILLA P, VINCOLI N, MOCARELLI P (2000) Environmental exposure to dioxin: the Seveso experience. *Andrologia* **32**:263-270
- VAN DEN BERG M, DE JONGH J, POIGER H, OLSON JR (1994) The toxicokinetics and metabolism of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and dibenzofurans (PCDFs) and their relevance for toxicity. *Crit Rev Toxicol* **24**:1-74

WEBSTER T, COMMONER B (1994) Overview: the dioxin debate. In: Dioxins and health (Schechter A, ed) Plenum Press, New York, pp 1-50

ZOBER M, PÄPKE O (1993) Concentrations of PCDDs and PCDFs in human tissue 36 years after accidental dioxin exposure. Chemosphere **27**:413-418

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Prof. Dr. Helge, der seit mehr als zehn Jahren in allen die Forschung betreffenden Dingen mein wichtigster Diskussionspartner ist, der für alle Probleme jederzeit zur Verfügung stand und steht, und der durch seine wohlwollende und zugleich kritische Herangehensweise immer zu einer deutlichen Verbesserung und Bereicherung meiner Arbeiten beigetragen hat.

Bedanken möchte ich mich zudem bei Prof. Dr. Neubert, über den ich zu diesem Forschungsthema gekommen bin, und von dem ich viel lernen konnte.

Zuletzt gilt mein Dank Prof. Dr. Wahn, der mir nach der Emeritierung von Prof. Dr. Helge die Fortführung meiner Forschungsarbeiten an der Klinik ermöglicht hat und mich in allen Angelegenheiten immer großzügig unterstützt hat.

Abschlußbericht des Projektes

**Belastung von Säuglingen mit
polychlorierten Dibenzo-p-dioxinen (PCDDs),
Dibenzofuranen (PCDFs) und Biphenylen (PCBs)
und deren Auswirkung auf sensible biologische
Parameter**

(PUG U 96 005)

Dr. Klaus Abraham
Kinderklinik der Charité, Campus Virchow-Klinikum,
Augustenburger Platz 1, 13 353 Berlin

März 2000

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	4
1.1 Säuglinge	6
1.2 Studienziele	9
2. Studienkonzept	10
2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehungen	10
2.2 Individuelle Exposition	11
2.3 Confounder	11
2.4 Biologische Parameter	12
2.5 Fallzahl	13
2.6 Auswahlkriterien	14
3. Probanden-Rekrutierung	15
3.1 Nicht gestillte Kinder	15
3.2 Gestillte Kinder in Berlin	15
3.3 Gestillte Kinder mit höherer PCDD/PCDF-Exposition	16
3.3.1 Untersuchungsämter der Länder	16
3.3.2 Region Ilsenburg/Harz	16
4. Das Studienkollektiv	19
4.1 Grundlegende Daten	19
4.2 Nicht gestillte Kinder	22
4.3 Gestillte Kinder	22
5. Untersuchungsmethoden	26
5.1 Blutentnahme	26
5.1.1 Wiederholungs-Untersuchungen	26
5.2 Der ¹³ C-Koffein-Atemtest	27
5.3 Labormethoden	27
5.3.1 EDTA-Blut	27
5.3.2 Heparin-Vollblut	27
5.3.3 Heparin-Plasma	29
5.3.4 PBMCs und Granulozyten	29
5.3.5 Weitere Methoden	30
5.3.6 POP-Analytik (O. Pöpke, ERGO Forschungsgesellschaft)	31
5.3.7 Statistische Verfahren	32

6. Ergebnisse: Laborbestimmungen	33
6.1 Der ¹³ C-Koffein-Atemtest	33
6.2 Erwähnenswerte Laborergebnisse (biologische Parameter)	34
6.2.1 Leukozytose bei Streß	35
6.2.2 Alkalische Phosphatase	35
6.2.3 C-reaktives Protein (CrP)	36
6.2.4 Eiweiß und Eisen-Versorgung gestillter Kinder	37
6.2.5 Immunreaktionen auf Impfungen	37
6.2.6 Gesamt-Cholesterin	39
6.2.7 Ah-Rezeptor-Polymorphismus	39
6.2.8 Schwermetalle	39
6.2.9 Nitrat/Nitrit im Trinkwasser	40
6.2.10 Kotinin im Urin	40
6.3 Biologische Variation von Laborparametern	41
7. Ergebnisse: POP-Analysen	44
7.1 Gestillte Kinder	45
7.2 Nicht gestillte Kinder	49
7.3 Vergleich gestillte – nicht gestillte Kinder	51
7.4 Mütterliche POP-Werte	52
7.5 Akkumulation von POPs in Abhängigkeit von der Stilldauer	53
7.6 Vergleich von I-TEq-Konzentrationen in Muttermilch und -blut	56
8. Ergebnisse: Veränderungen biologischer Parameter durch POPs ?	60
8.1 Körper- und Zahnentwicklung, anamnestische Angaben	60
8.2 Biologische Parameter	63
8.2.1 Klinische Chemie	63
8.2.2 Schilddrüsenhormone	69
8.2.3 Humorales Immunsystem	71
8.2.4 Zelluläres Immunsystem	74
9. Abschließende Diskussion und Bewertung	78
9.1 Studienkonzept und dessen Umsetzung	78
9.2 Gemessene biologische Parameter	78
9.3 POP-Kinetik während des Stillens	79
9.4 POP-Wirkungen auf biologische Parameter ?	79
10. Literatur	82
11. Danksagung	87
12. Zusammenfassung	89

1. Einleitung

Eine heterogene Gruppe von polyhalogenierten Kohlenwasserstoffe hat in den letzten Jahrzehnten Wissenschaft und Öffentlichkeit beschäftigt hinsichtlich möglicher Gesundheitsgefahren. Es geht um überwiegend vom Menschen im Rahmen der gewaltigen industriellen Entwicklung des 20. Jahrhunderts geschaffene Verbindungen, die sich durch zwei Eigenschaften hervortun: ihre große chemische und biologische Stabilität, sowie ihre große Lipophilie. Beide Eigenschaften führen durch Verteilungsprozesse in den Weltmeeren und in der Atmosphäre zu einer ubiquitären Verbreitung und zu einer Speicherung in Fettkompartimenten von Lebewesen, die wiederum zu einer Anreicherung in der Nahrungskette führt. Relativ hohe Konzentrationen lassen sich daher im Fettgewebe von Säugetieren und beim Menschen nachweisen. Für diese Verbindungen hat sich in den letzten Jahren ein neuer Begriff durchgesetzt, der die wesentlichen Eigenschaften zusammenfaßt: Persistent Organic Pollutants (POPs).

Zu dieser wie gesagt sehr heterogenen Gruppe gehören Verbindungen wie die polychlorierten Dibenzo-p-dioxine und -furane (PCDDs, PCDFs), von denen nur die 17 2,3,7,8-chlorierten Kongenere akkumulieren. Diese Verbindungen entstehen bei verschiedenen thermischen Prozessen mit Chlor-Beteiligung. Seit dem Unfall 1976 im italienischen Seveso sind "Dioxine" zum Inbegriff einer möglichen schleichenden Vergiftung geworden, die weder mit den naturgegebenen Sinnen des Menschen wahrzunehmen ist noch mit der damals zur Verfügung stehenden analytischen Technik zu erfassen war. Ein Teil der PCDD/PCDF-Verbindungen hat ein relativ großes toxisches Potential, liegt aber im Hintergrundbereich in sehr niedrigen Konzentrationen vor (pg/g- = ppt-Bereich).

Die in sich schon sehr heterogene Gruppe der 209 möglichen polychlorierten Biphenyle (PCBs) beinhaltet Verbindungen mit mehr oder weniger stark "dioxin"-ähnlichem Wirkpotential (co-planare PCBs: Nr. 77, 126, 169; mono-ortho-PCBs: Nr. 105, 118, 156). Im Hintergrundbereich haben die PCBs 138, 153 und 180 den größten Anteil (ca. 60%) und dienen zusammen mit den PCBs 28, 52 und 101 als sogenannte Indikator-PCBs, deren Analyse einen Anhalt für die Gesamt-PCB-Exposition ergibt. PCBs wurden als Gemische unterschiedlicher Zusammensetzung kommerziell produziert (Verwendung z.B. als Transformatoröl), ihre Verwendung ist in der Bundesrepublik seit 1978 verboten.

Teilweise ebenfalls bereits längere Zeit verboten sind als Insektizide eingesetzte Substanzen bzw. deren Abbauprodukte, die im Hintergrundbereich immer noch mit die höchsten Konzentrationen haben: DDE als Hauptmetabolit von DDT, Hexachlorbenzol (HCB, auch Verbrennungsprodukt) und β -Hexachlorcyclohexan (β -HCH) als langlebige Komponente von Lindan (γ -HCH). Weitere persistente organische Chlorkohlenstoff-Verbindungsgruppen sind durch moderne analytische Verfahren inzwischen identifiziert und durch die Entwicklung von Standards auch quantifizierbar geworden. Hierzu gehören die früher ebenfalls als Insektizide eingesetzten Toxaphene oder die polybromierten Diphenylether, die als Flammenschutzmittel eingesetzt werden. Ein kritischer Punkt der POP-Problematik bleibt der enorme technische und personelle Aufwand bei der Analytik, der entsprechende Kosten verursacht.

Die Kinetik der genannten Verbindungen folgt wie dargestellt relativ einfachen Gesetzmäßigkeiten. Demgegenüber ungewöhnlich komplex ist jedoch die Frage, wie diese

Verbindungen hinsichtlich möglicher Effekte zu beurteilen sind, z.B. in Bezug auf die relativ hohen Hintergrund-Konzentrationen beim Menschen. Bei der Erforschung der Toxikologie von PCDDs/PCDFs und PCBs sind in den letzten Jahrzehnten große Anstrengungen unternommen worden, wesentliche Fragen sind inzwischen genauer zu beantworten (Überblick z.B. in NEUBERT 1998). Es bleiben jedoch noch etliche Fragen offen (einige sind vermutlich nie zu beantworten), und bei der Interpretation von tierexperimentellen und epidemiologischen Studien gehen die Meinungen auch innerhalb der Wissenschaft z.T. weit auseinander, z.B. was die Frage der möglichen Kanzerogenität von Dioxinen angeht. Hier einen Überblick geben zu wollen würde den Rahmen dieser Einleitung bei weitem sprengen, die Probleme sollen jedoch stichwortartig kurz umrissen werden: unterschiedliche Muster von Effekten, Dosis-Wirkungs-Beziehungen und Kinetiken (Halbwertszeiten, Leber/Fett-Verteilung) bei unterschiedlichen Spezies machen eine Übertragbarkeit von tierexperimentellen Ergebnissen auf den Menschen noch problematischer als dies üblicherweise der Fall ist; epidemiologische Studien nach Unfällen und bei höherer Exposition beim Menschen sind bei geringen Effekten durch die üblichen Probleme von Auswahl, Confoundern und Fallzahl in ihrer Aussage beschränkt, hinzu kommt häufig die ungenügende Dokumentation der Exposition; im Hintergrundbereich liegen immer komplexe Gemische aus unterschiedlichen Verbindungen vor, die sich gegenseitig in ihrer Wirkung beeinflussen können.

Hinsichtlich gesicherter klinischer Effekte von PCDDs/PCDFs/PCBs beim Menschen ist zu sagen, daß diese Verbindungen (neben anderen) eine sogenannte Chlorakne auslösen können, wie z.B. nach dem Seveso-Unfall 1976 durch 2378-TCDD-Exposition. Interindividuell scheint es dabei große Differenzen bezüglich der Empfindlichkeit zu geben, schwere Chlorakne (Grad III und IV) konnte ab einer Konzentration von ca. 800 ppt 2378-TCDD beobachtet werden (MOCARELLI et al., 1991a). Bei den Unglücken mit PCDF/PCB-kontaminiertem Reisöl 1968 in Yusho (Japan) und 1979 in Yu-Cheng (Taiwan) wurden darüber hinaus weitere Symptome beobachtet, bei denen jedoch die ursächliche Differenzierung zwischen PCDFs und PCBs schwierig war (Lü and Wu, 1985).

Bei deutlichen klinischen Effekten (Chlorakne) war auch anzunehmen, daß subklinische Veränderungen zu beobachten sind, z.B. in Form pathologischer Werte für bestimmte Laborparameter. Überraschenderweise fanden sich bei der umfangreichen Nachuntersuchung der Seveso-Opfer außer vorübergehend leicht erhöhten Leberenzymen (γ -GT, GPT) und Lymphozyten-Werten (ev. infolge der Chlorakne selbst) bei einigen Patienten keine auffälligen Laborparameter (MOCARELLI et al., 1991b). Vorübergehende Erniedrigungen von den Immunglobulinen IgA und IgM (aber nicht von IgG), Veränderungen bei T-Lymphozyten (als Prozentsatz der Lymphozyten und bei Subpopulationen) und bei der Lymphozyten-Proliferation wurden nach dem Yu-Cheng-Unfall 1979 berichtet (Lü and Wu, 1985). Für das Immunsystem wurden bei weniger hoch Dioxin-exponierten Studienkollektiven oder bei Chemiearbeitern lange Zeit (z.T. Jahrzehnte) nach der höchsten Exposition in jüngeren Untersuchungen mit empfindlicheren Methoden verschiedene geringe Auffälligkeiten beschrieben (ERNST et al., 1998; JUNG et al., 1998; NEUBERT et al., 1993; NEUBERT et al., 1995; OTT et al., 1994; SVENSSON et al., 1994; TONN et al., 1998; WINKER et al., 1996). Die Ergebnisse sind insgesamt wenig überzeugend im Hinblick auf eine kausale Beziehung zwischen den beobachteten Veränderungen und der POP-Exposition. Zusammenfassend läßt sich für das Immunsystem sagen, daß keine konsistenten Resultate vorliegen, die die

Identifikation von empfindlichen Parametern (biomarker of response) bei Erwachsenen erlauben würden. Ähnliches gilt für mögliche Einwirkungen von POPs auf das Hormonsystem. Bemerkenswert und bislang ungeklärt bleibt der Befund einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses von Mädchen und Jungen (Sex-Ratio) bei den Nachkommen von hoch 2378-TCDD-exponierten Eltern nach dem Unfall von Seveso (MOCARELLI et al., 1998). Ein entsprechender Effekt fand sich in der hoch PCDF/PCB-exponierten Yu-Cheng-Kohorte nicht (ROGAN et al., 1999).

Die Zytochrom P450-Induktion (CYP) in der Leber ist ein empfindlicher Parameter für die Wirkung von PCDDs/PCDFs. Dies konnte in allen untersuchten Säugetierspezies gezeigt werden, es liegt eine klare Dosis-Wirkungs-Beziehung vor (z.B. ABRAHAM et al., 1988). In den letzten Jahren wurden die intrazellulären Mechanismen weitgehend aufgeklärt: z.B. 2378-TCDD bindet (mit höchster Affinität von allen PCDDs/PCDFs) an den zytoplasmatischen Ah-Rezeptor. Dieser Komplex bewirkt schließlich im Zellkern die Transskription mit Bildung von m-RNA, die zur de-novo-Synthese des Zytochrom-Proteins führt. In der unterschiedlichen Rezeptor-Affinität der verschiedenen PCDDs/PCDFs begründet sich deren unterschiedliches Wirkpotential, und hieraus ergibt sich auch die Rechtfertigung für das Konzept der Toxizitäts-Äquivalente: Toxizitäts-Äquivalenz-Faktoren (TEFs) ermöglichen für jede Verbindung die Berechnung einer zu 2378-TCDD äquivalenten Konzentration; diese Werte dürfen zu einem Gesamt-Toxizitäts-Äquivalent addiert werden (z.B. I-TE_q = Internationale Toxizitäts-Äquivalente bei Verwendung der 1988 von einer NATO-Arbeitsgruppe etablierten I-TEFs). Dies gilt jedoch nur für Ah-Rezeptor-vermittelte Wirkungen unter Annahme additiver Wirkungen.

Auch für den Menschen war anzunehmen, daß ähnliche Mechanismen in der Leber bei PCDD/PCDF-Exposition wirksam werden. Da eine direkte Untersuchung von Lebermaterial jedoch nicht möglich ist, stehen in diesem Fall nur indirekte Untersuchungsverfahren zur Verfügung. Hier hat sich die Messung der Metabolisierungs-Geschwindigkeit von oral appliziertem Koffein bewährt, das überwiegend in der Leber von CYP1A2 umgesetzt wird (Urin-Metaboliten, ¹³C-Koffein-Atemtest). Tatsächlich konnte bei hoch PCDF/PCB-exponierten Yu-Cheng-Patienten (LAMBERT et al., 1994) und bei hoch 2378-TCDD-exponierten Personen aus Wien (ABRAHAM et al., 1999) die Induktion nachgewiesen werden. Die Dosis-Wirkungs-Kurve verläuft jedoch flacher als bei Nagetieren, und es ist zur Zeit ungeklärt, ob dies durch die nur indirekten Meßverfahren bedingt ist, oder ob die Ursache in der geringeren Induzierbarkeit der menschlichen Leber liegt.

1.1 Säuglinge

Im Zusammenhang mit der Diskussion um POPs im Hintergrundbereich nehmen Säuglinge eine besondere Stellung ein. Bei gestillten Kindern ist zu erwarten, daß mit zunehmender Dauer der Stillperiode die Konzentrationen von POP-Verbindungen ansteigen und ab einem bestimmten Zeitpunkt die mütterlichen Konzentrationen überschreiten. Theoretisch ist bei z.B. sechs Monate lang voll gestillten Kindern zum Zeitpunkt des Abstillens ein 2,9-fach höherer Werte im Vergleich zur Mutter zu erwarten (z.B. NEUBERT 1988). Daß lange gestillte Kinder tatsächlich höhere Werte erreichen als ihre Mütter, konnte bereits Ende der 70er Jahre für PCBs gezeigt werden (z.B. KODAMA und OTA, 1980). Eigene Untersuchungen konnten

dies für PCDDs/PCDFs und co-planare PCBs bestätigen: im Alter von 11 Monaten hatten zwei 26 bzw. 30 Wochen lang gestillte Kinder 2,4- bzw. 3,6-fach höhere I-TEQ-Werte im Vergleich zur Mutter (ABRAHAM et al., 1996). In diese Zahlen geht der Abfall der mütterlichen POP-Konzentrationen während der Stillperiode mit ein. Daß die Mutter erhebliche Mengen dieser Verbindungen mit der Milch an das Kind abgibt, zeigten auch spätere Untersuchungen der gleich lang gestillten Geschwister der o.g. Kinder im gleichen Alter von 11 Monaten, deren I-TEQ-Werte nur noch ca. halb so hoch waren wie die der älteren Geschwister (ABRAHAM et al., 1998a). Nicht gestillte Kinder hatten entsprechend den Erwartungen im Alter von 11 Monaten deutlich niedrigere Werte als die Mutter (ABRAHAM et al., 1996). Nach einer Stillperiode von 6 bis 7 Monaten unterschieden sich die gestillten von den nicht gestillten Kindern in der POP-Konzentration somit ca. um den Faktor 10, wenn es jeweils das erste Kind der Mutter war. Ein schnelles Angleichen dieses großen Unterschiedes zwischen gestillten und nicht gestillten Kindern ist theoretisch nicht zu erwarten. Für PCBs konnten im Alter von 3,5 Jahren immer noch 3,6-fach höhere Werte bei 91 im Mittel ca. 20 Wochen gestillten Kindern gemessen werden im Vergleich mit 82 nicht gestillten Kindern (PATANDIN et al., 1997).

Dieser kinetische Aspekt der deutlichen Akkumulation bei lange gestillten Kindern begründet im wesentlichen die Sorge um mögliche unerwünschte Wirkungen dieser Verbindungen, die sicherlich keinen Nutzen im menschlichen Organismus haben. Es stellt sich somit die Frage einer Risiko-Bewertung, die dann auch Konsequenzen in Form einer einschränkenden Stillempfehlung haben könnte. Eine entsprechende Bewertung dieser Frage ist jedoch besonders schwierig, weil viele Aspekte zu berücksichtigen sind:

- Es liegen kaum Daten über gesicherte POP-Wirkungen beim Menschen vor, die für eine Risiko-Bewertung geeignet sind. Dies gilt insbesondere für Säuglinge und Kleinkinder, die möglicherweise durch die stattfindende Entwicklung von Organsystemen und -funktionen empfindlicher sind als größere Kinder und Erwachsene. Zudem ist zu berücksichtigen, daß Säuglinge noch ein ganzes Leben vor sich haben, und sich mögliche Langzeiteffekte besonders gravierend auswirken könnten.

- Andererseits hat Stillen zahlreiche Vorteile für Kind und Mutter, die teilweise gut untersucht sind. Hierzu gehören die optimale physiologische Zusammensetzung der Muttermilch und Fehlermöglichkeiten bei der Zubereitung von Flaschennahrung (Anzahl der Meßlöffel, Hygiene, Temperatur) – dies gilt um so mehr bei schlechten sozialen Verhältnissen und in unterentwickelten Ländern. Muttermilch enthält zahlreiche immunologisch wirksame Substanzen, verschiedenen Untersuchungen konnten eine geringere Zahl von bakteriellen Infektionen nachweisen. Die Rolle bei der Allergie-Prävention wird zur Zeit neu diskutiert, in jedem Fall ist bei Kuhmilch-Allergie die Muttermilch käuflichen hypoallergen Milchen überlegen. Nicht zuletzt sprechen psychologische Aspekte einer intensiveren Mutter-Kind-Bindung für die weltweit einhellige Meinung der Kinderärzte, daß Kinder generell in den ersten Monaten gestillt werden sollten.

Es wäre daher die beste aller denkbaren Möglichkeiten, wenn sich mit den zur Zeit zur Verfügung stehenden Methoden keine Effekte von POPs (bei Konzentrationen im Hintergrundbereich) auf biologische Funktionen wie Immunsystem, Hormonsystem und Leberfunktion nachweisen ließen (auch auf keine physiologischen Reaktionen wie z.B. die Enzyminduktion).

Von vornherein grundsätzlich auszuschließen ist ein solcher POP-Effekt nicht. Wie oben bereits erwähnt, ist eine Übertragung tierexperimenteller Untersuchungen auf den Menschen aus vielen Gründen problematisch, diese geben jedoch einen groben Anhalt dafür, in welchem Konzentrationsbereich überhaupt mit Wirkungen zu rechnen ist. Als sensibelster Indikator für die Wirkung von Dioxinen wurde im Tierversuch die erwähnte Zytochrom P450-abhängige Induktion von Leberenzymen (z.B. ABRAHAM et al., 1988; KRÜGER et al., 1990) und die Veränderung von bestimmten Lymphozyten-Subpopulationen (z.B. NEUBERT et al., 1990) beschrieben. Beide Effekte konnten schon nach einer einmaligen Applikation von 3 bzw. 10 ng 2378-TCDD/kg Körpergewicht beobachtet werden. Ein gestilltes Kind, daß in den ersten Lebenswochen täglich PCDD/Fs in der Größenordnung von 100 pg I-TEq/kg Körpergewicht (ABRAHAM et al., 1996) zu sich nimmt, erreicht eine kumulative Dosis von 3 ng I-TEq/kg Körpergewicht unter Berücksichtigung der Zunahme der Körperfettmasse nach einigen Wochen.

In den letzten Jahren wurden bei gestillten Kindern von verschiedenen Arbeitsgruppen Untersuchungen mit der Frage möglicher POP-Wirkungen bei im Hintergrundbereich liegenden Konzentrationen durchgeführt. Ohne die sich teilweise widersprechenden Arbeiten hier im einzelnen hinsichtlich ihrer Qualität und Aussagekraft bewerten zu wollen, sollen deren Ergebnisse kurz dargestellt werden. Bei der Untersuchung von Lymphozyten-Subpopulationen wurde bei kanadischen Inuits über fallende CD4/CD8-Ratios mit steigender PCB-Konzentration in der Muttermilch (Alter 3, 6 und 12 Monate) berichtet (DEWAILLY et al., 1993). Im Gegensatz dazu berichteten NAGAYAMA et al. (1998a) über steigende CD4/CD8-Ratios bei 36 einjährigen Kindern in Abhängigkeit von der I-TEq-Aufnahme mit der Muttermilch. Nach der Untersuchung von insgesamt 93 Kindern und Anwendung der Spearman-Korrelations-Analyse war das Ergebnis jedoch nicht mehr signifikant (NAGAYAMA et al., 1998b), dagegen zeigte sich nun eine signifikant negative Assoziation von Prozentsatz der B-Zellen und DDT-Konzentration in der Muttermilch (NAGAYAMA et al., 1998c). Bei Untersuchungen von 19 gestillten und 21 nicht gestillten Kindern an unserer Klinik war keine Korrelation von Lymphozyten-Subpopulationen mit der PCDD/PCDF-Konzentration in der Muttermilch nachweisbar, jedoch zeigte sich im Alter von einer Woche und von fünf Monaten ein leichter Abfall der CD4⁺-Lymphozyten mit zunehmendem elterlichen Zigarettenkonsum (SCHMITT et al., 1992). Bei Kindern im Alter von 3 Monaten wurde über geringere Granulozyten- und Monozyten-Zahlen sowie über eine geringere Zahl von B-Zellen in Assoziation mit der postnatalen PCB-Exposition berichtet, die im Alter von 18 Monaten nicht mehr nachweisbar war (WEISGLAS-KUPERUS et al., 1995).

Für die Schilddrüsenfunktion wurde bei 78 gestillten Kindern, die in zwei Gruppen mit niedrigerer und höherer TEQ-Konzentration in der Muttermilch (inklusive PCBs) eingeteilt wurden, über signifikante Gruppenunterschiede in der 2. Lebenswoche (niedrigeres Gesamt-Thyroxin: Ges.-T₄; höheres Thyroid-stimulierendes Hormon: TSH) und im 3. Lebensmonat (höheres TSH) berichtet (KOOPMAN-ESSEBOOM et al., 1994). Signifikant negative Assoziationen zwischen Ges.-T₃ bzw. Ges.-T₄ (aber nicht TSH) und der Gesamt-TEQ-Aufnahme beschrieben NAGAYAMA et al. (1998d) bei 36 gestillten Kindern im Alter von einem Jahr, die am Ende der Untersuchung (92 Kinder) zumindest für PCBs nicht mehr signifikant war (NAGAYAMA et al., 1998e).

Bei der Untersuchung von 19 gestillten und 21 nicht gestillten Kindern an unserer Klinik wurde 1991 im Alter von einer Woche die Enzyminduktion mit dem ^{13}C -Methacetin-Atemtest untersucht (GRÜTERS et al., 1992). Es fand sich entgegen der Erwartung eine höhere Induktion bei den nicht gestillten Kindern, die im Alter von 3 Monaten nicht mehr nachweisbar war. Dies war vermutlich durch den höheren Anteil an rauchenden Müttern bei den nicht gestillten Kindern bedingt. Eine signifikante Korrelation mit dem 2378-TCDD-Gehalt der Muttermilch lag bei den gestillten Kindern nicht vor.

Zusammenfassend läßt sich über diese Arbeiten bezüglich möglicher PCDD/PCDF/PCB-Effekte bei gestillten Kindern mit POP-Konzentrationen im Hintergrundbereich sagen, daß es keine konsistenten Befunde gibt, alle gemessenen Werte innerhalb des Normalbereichs liegen, und bei einigen Arbeiten Zweifel an der wissenschaftlichen Sorgfalt angebracht sind. Eine neue Studie erschien daher notwendig.

1.2 Studienziele

Es soll mit dieser Studie eine mit zuverlässigen Daten belegbare Antwort auf die Frage gegeben werden, ob und gegebenenfalls oberhalb welcher Konzentration durch die postnatale Exposition von gestillten Säuglingen mit PCDDs, PCDFs und PCBs Veränderungen von sensiblen biologischen Parametern auftreten. Die Bedeutung und Anwendbarkeit der Ergebnisse würde in erster Linie darin liegen, auf dieser Basis eine besser begründete Stillempfehlung geben zu können.

Als untergeordnete Frage geht es zudem um die genauere Beschreibung der kindlichen Konzentrationen von PCDD/Fs und verwandten Verbindungen in Abhängigkeit von den mütterlichen Konzentrationen und der Stilldauer.

Diskutiert werden als mögliche POP-Wirkungen, insbesondere von PCBs, auch negative Einflüsse auf intrauterine Wachstumsparameter sowie die neurologische und mentale Entwicklung der Kinder in Abhängigkeit von der pränatalen Exposition. Hierzu kann diese Studie keine Antworten beitragen, da das Studienkonzept auf die postnatale Exposition durch das Stillen ausgerichtet ist.

2. Studienkonzept

Bei der Entwicklung des Studienkonzeptes galt es, die verschiedenen grundsätzliche Aspekte des dargestellten Problems zu berücksichtigen:

2.1 Dosis-Wirkungs-Beziehungen

Bei der Betrachtung möglicher POP-Wirkungen ist davon auszugehen, daß diese dosis- bzw. konzentrationsabhängig sind. Die Einbeziehung von Kindern mit möglichst hohen POP-Konzentrationen ist daher sinnvoll, auch um den "worst case" einzubeziehen, wie er bei der zur Zeit in der Bundesrepublik Deutschland vorliegenden Hintergrundexposition auftreten kann. Gleichzeitig ist zum Vergleich die Einbeziehung von Kindern mit möglichst niedriger POP-Konzentration erforderlich: je größer die Spanne zwischen niedrigen und hohen Konzentrationen ist, um so fundierter kann die Bewertung hinsichtlich eventueller POP-Wirkungen sein.

Die während der Stillperiode beim Kind erreichten POP-Konzentrationen werden im wesentlichen von 2 Faktoren bestimmt: von der Stilldauer und der POP-Konzentration in der Muttermilch. Es ist daher sinnvoll, Mütter mit erwarteter relativ hoher POP-Exposition einzubeziehen (ältere Mütter mit erstem gestillten Kind, Mütter aus Regionen mit bekannter erhöhter Belastung aufgrund lokaler Emissionsquellen), die ihre Kinder sehr lange stillen. Eine Untersuchung der Kinder im Alter von ca. einem Jahr erschien dabei sinnvoll, um einerseits noch genügend Kinder einschließen zu können, die noch (teil)gestillt werden und deren erwartete POP-Konzentration somit im Bereich der maximal vom einzelnen Kind während der Kindheit erreichten Werte liegt. Andererseits sind Kinder in diesem Alter groß genug für eine Blutentnahme mit einem Volumen von 15 ml, das für das geplante umfangreiche Untersuchungsprogramm erforderlich war.

Für die Kinder mit relativ niedriger POP-Konzentration war entsprechend nach Müttern mit zu erwartender relativ niedriger Exposition (jüngere Mutter; Mütter, die weitere Kinder schon längere Zeit gestillt hatten) und relativ kurzer Stilldauer zu suchen. Hier wäre es sicher nicht sinnvoll gewesen, nicht gestillte Kinder (mit sicherlich im Alter von einem Jahr sehr niedrigen POP-Konzentrationen) als wesentliche Gruppe für den Vergleich mit höher exponierten Kindern zu wählen: bei Unterschieden in biologischen Parametern zwischen lange gestillten und nicht gestillten Kindern könnte nicht differenziert werden zwischen den POP-Konzentrations-Differenzen und dem möglichen Confounder unterschiedliche Ernährung als Ursache (z.B. immunmodulatorische Funktion der Muttermilch). Eine Mindeststilldauer von 4 Monaten erschien aus pragmatischen Gründen sinnvoll, da eine zu enge Festlegung u.U. die Rekrutierung erschwert hätte. Es ist jedoch zu beachten, daß auch bei den gestillten Kindern die unterschiedliche Stilldauer als möglicher Confounder in Frage kommt.

Die zusätzliche Einbeziehung nicht gestillter Kinder erschien aus verschiedenen Gründen dennoch sinnvoll: zur Erweiterung von kinetischen Erkenntnissen (Verhältnis von POP-Konzentrationen von Mutter und Kind) und von Interpretationsmöglichkeiten für die Gesamtbeurteilung. So wäre z.B. theoretisch denkbar, daß sich für einen bestimmten

biologischen Parameter positive Effekte des Stillens durch eine höhere POP-Exposition reduzierten, im Vergleich zu nicht gestillten Kindern diese positiven Effekte aber noch überwogen.

2.2 Individuelle Exposition

Die Erfassung der individuellen Exposition des Kindes war eine Grundvoraussetzung für die geplante Studie. Die Abschätzung über die POP-Konzentration in der Muttermilch und die Stilldauer, wie sie von den bisher zu diesem Problemfeld durchgeführten Studien benutzt wurde, hat sicherlich erhebliche Unsicherheitsfaktoren (anamnestische Ungenauigkeit der Stilldauer, Tag-zu-Tag-Variation von Trinkmenge, Fettgehalt und möglicherweise der POP-Konzentration im MilCHFett; Resorptionsraten; POP-Gehalt in gefütterter Beikost; Verdünnungs- und Konzentrationseffekte aufgrund des Aufbaus bzw. Abbaus von Fettdepots). Die individuelle Messung der tatsächlich zum Zeitpunkt der Untersuchung vorliegenden POP-Konzentrationen im Blutfett wäre der dargestellten Abschätzung deutlich überlegen, sofern dies realisierbar sein würde (Problem: geringe verfügbare Blutmenge, höhere Kosten). Die gleichzeitige Bestimmung der POP-Konzentrationen im mütterlichen Blut könnte zudem die Akkumulation dieser Verbindungen im Kind in Abhängigkeit von der Stilldauer erstmals für eine größere Zahl von Mutter/Kind-Paaren ermitteln. Bei der Bestimmung der POP-Verbindungen sollten möglichst alle relevanten Substanzen aus dieser heterogenen Gruppe erfaßt werden.

2.3 Confounder

Als ein wesentliches grundsätzliches Problem bei epidemiologischen Studien war die Betrachtung möglicher Confounder wesentlich bei der Studienplanung. Grundsätzlich sollten sich die zu untersuchenden Kinder möglichst wenig hinsichtlich anderer die Studie beeinflussender Faktoren unterscheiden. Wesentliches Auswahlkriterium war daher zunächst die ausschließliche Berücksichtigung von gesunden Kindern mit normaler Entwicklung (keine Frühgeborenen, keine Kinder mit chronischen Erkrankungen).

- Das *Alter* ist sicherlich ein wichtiger Faktor, da sich einige biologische Funktionen (z.B. des Immunsystems) gerade im jungen Kindesalter rasch entwickeln. Daher war die Beschränkung auf eine relativ eng begrenzte Altersgruppe erforderlich.
- Ein möglicher Einfluß passiven *Rauchens* wurde durch die Beschränkung auf nicht rauchende Eltern ausgeschlossen. Für die nicht gestillten Kinder war jedoch die Untersuchung einer Untergruppe mit passiver Zigarettenrauch-Exposition insofern interessant, als hierdurch der Einfluß dieser bekannten Umwelttoxine auf biologische Parameter in diesem Alter mit untersucht werden konnte und eventuelle Effekte in Relation zu eventuellen Effekten durch POP-Exposition gesetzt werden könnten.
- Da auch unzureichende Daten hinsichtlich möglicher *kultureller und genetischer Einflüsse* auf biologische Parameter durch unterschiedliche Abstammung vorlagen, wurde die Untersuchung auf aus dem deutschsprachigen Raum abstammende Eltern beschränkt.

- Andere, nicht von vornherein ausschließbare mögliche Confounder sollten erfaßt und bei der statistischen Auswertung entsprechend berücksichtigt werden: durch Erhebung anamnestischer Daten (z.B. soziale Faktoren, Zahl der bisherigen Infekte) sowie die Messung von Parameter, die weitere Umweltfaktoren erfassen (z.B. Schwermetalle: Co-Exposition gegenüber anderen Umwelt-Kontaminanten). Besondere Bedeutung kommt dem *Vorliegen von banalen Infekten der Atemwege* zu, die gerade am Ende des ersten Lebensjahres besonders häufig auftreten und einen Einfluß auf einige Parameter des Immunsystems haben. Die Kinder sollten daher in den letzten 2 Wochen vor der Untersuchung kein Fieber gehabt haben und insgesamt in gutem Allgemeinzustand gewesen sein. Geringe Zeichen von Luftwegsinfekten in dieser Zeit und bei der Blutentnahme wurden akzeptiert, um das Herausfallen von vielen bereits rekrutierten Kindern zu verhindern und einen Selektion-Bias durch die ausschließliche Beschränkung auf Kinder mit besonders stabilem Immunsystem zu vermeiden.

2.4 Biologische Parameter

Bei der Auswahl der zu untersuchenden biologischer Parameter stand die Überlegung im Vordergrund, daß außer der Zytochrom P450-Induktion in der Leber für den in Betracht kommenden Dosisbereich keine eindeutig identifizierten Biomarker bekannt sind, auf deren alleinige Untersuchung sich die Studie hätte beschränken können. Wie in der Einleitung ausgeführt, gibt es inzwischen für moderat belastete Erwachsene und gestillte Säuglinge einige Arbeiten, die Assoziationen zwischen POP-Konzentrationen und verschiedenen biologischen Parametern beschreiben. Die Ergebnisse sind jedoch nicht konsistent.

Die Auswahl der zu untersuchenden biologischer Parameter, insbesondere der des Immunsystems, wurde daher auf eine umfassende Untersuchung möglicher Endpunkte angelegt, um bei großem Aufwand (Kosten POP-Analytik, Rekrutierung) möglichst viele Parameter mit einzubeziehen. Als grundsätzliche Kritik hieran wurde die steigende Wahrscheinlichkeit rein zufällig auftretender signifikanter Assoziationen geäußert. Dies trifft natürlich zu. Hierbei ist jedoch zu bedenken, daß das Risiko einer zufälligen Assoziationen für einen bestimmten Parameter auf einem bestimmten Signifikanz-Niveau jeweils gleich ist, bei vielen untersuchten Parametern die erwartete Zahl von derartigen Zufälligkeiten jedoch genauer zu bestimmen ist und bei der Interpretation der Daten berücksichtigt werden kann. Da zudem viele Parameter gerade des Immunsystems über physiologische Zusammenhänge miteinander verknüpft sind, wird die Interpretation durch den Vergleich mit anderen, ebenfalls untersuchten Parametern erleichtert.

Eine zusätzliche wichtige Hilfe für die Dateninterpretation ergab sich erst während der Studie durch den Umstand, daß bei insgesamt 36 Kindern eine zweite Untersuchung im Abstand von ca. 4 Wochen vorgenommen werden konnte (siehe 5.1.1.), durch die für alle untersuchten Parameter nun Daten über die intraindividuelle Reproduzierbarkeit innerhalb dieses Zeitraumes gewonnen werden konnten. Da für möglicherweise von POPs beeinflusste biologische Parameter (bei weitgehender individueller Konstanz der POP-Konzentrationen) keine starke Schwankung der Werte bei zwei kurz aufeinander folgenden Untersuchungen zu erwarten ist (im Vergleich zur Gesamtvarianz des Parameters im Studienkollektiv), konnte die

Zahl der auf eine mögliche POP-Wirkung hin auszuwertenden biologischen Parameter eingegrenzt werden.

Grundsätzlich ist an dieser Stelle ebenfalls zu bedenken, daß als Voraussetzung für die Aufnahme eines biologischen Parameters in das Studienprogramm natürlich bestimmte methodische Voraussetzungen gegeben sein mußten. Dazu gehört, daß die Methode quantitativ auswertbare Resultate hervorbringt (nicht nur qualitative ja-nein Antworten), daß Inter- und Intra-Assay-Variabilität gering sind und daß die Methoden über die lange Untersuchungsperiode von fast 2 Jahren ausreichend stabil sind. Zudem war darauf zu achten, daß die Blutentnahme bei allen Kindern möglichst unter gleichen Bedingungen stattfand, und daß der Probentransport ins Labor eine bestimmte Zeit nicht überschreiten durfte, um Artefakte zu vermeiden (z.B. durch Funktionsverluste von weißen Blutzellen).

2.5 Fallzahl

Ein wesentlicher Punkt bei jeder epidemiologischen Studie ist natürlich die Bestimmung der Fallzahl. Als Mindestzahl pro Gruppe (vereinfacht: höhere – niedrigere POP-Exposition) wurde zunächst eine Zahl von 20 Kindern festgelegt. Statistisch liegt unter der Annahme normalverteilter Variabler, eines Signifikanz-Niveaus von $p < 0.05$ und einer statistischen Power von 0.8 bei einer Fallzahl von $n=20$ pro Gruppe bei Vergleich mit dem zweiseitigen t-Test der d-Wert (Abweichung der Mittelwerte der beiden Gruppen/Standardabweichung) bei 0.9, d.h. eine tatsächlich vorhandene Abweichung der Variablen kann mit 80%iger Wahrscheinlichkeit als signifikant ($p < 0.05$) erkannt werden, wenn diese Abweichung mindestens 90% der Standardabweichung beträgt. In diesem Bereich liegen von anderen Untersuchern mitgeteilte dosisabhängige Veränderungen wie z.B. CD4/CD8-Ratio (DEWAILLY et al., 1993) oder TSH-Konzentrationen im Serum (KOOPMAN-ESSEBOOM et al, 1994).

Eine höhere Fallzahl als $n=20$ pro Gruppe war dennoch zur Erhöhung der wissenschaftlichen Aussagekraft möglicherweise beobachteter Assoziationen wünschenswert. Die Mindestzahl wurde anfangs auch wegen der zunächst bestehenden Unsicherheit hinsichtlich der Bereitschaft von Eltern, ihre Kinder für eine Blutentnahme zur Verfügung zu stellen, niedrig angesetzt. Zudem waren die hohen Kosten für die Analytik zu bedenken. Durch die Bereitschaft des Projektträgers, weitere Mittel zur Verfügung zu stellen, und die im wesentlichen unproblematische Rekrutierung der Studienteilnehmer konnten insgesamt 80 lange gestillte Kinder untersucht werden. Mit wesentlich höherem Suchaufwand konnte zudem eine Gruppe von 21 nicht gestillten Kindern in die Studie aufgenommen werden.

2.6 Auswahlkriterien

Aufgrund der auf den vorherigen Seiten aufgeführten Überlegungen wurden konkret folgende Auswahlkriterien für die Studie festgelegt:

- Eltern: aus dem deutschsprachigen Raum abstammend.
- Alter: 4 Wochen-Spanne 341 bis 369 Tage = 11,2 bis 12,1 Monate (diese konkrete Spanne ergab sich während der Studie; die ursprünglich vorgesehene Alterspanne von 10 bis 12 Monaten konnte daher verkleinert werden).
- Stilldauer: nicht gestillte Kinder: Stillversuch kürzer als 14 Tage
gestillte Kinder: mindestens Vollstillzeit entsprechend 4 Monaten (inklusive anteilmäßiger Anrechnung von Teilstillzeiten)
- keine Exposition gegenüber Zigarettenrauch
(Mutter/Vater/Lebenspartner/Mitbewohner rauchen nicht bzw. nicht Zuhause, kein Aufenthalt des Kindes in Räumen, in denen geraucht wird; nicht gestillte Kinder mit passiver Zigarettenrauch-Exposition wurden akzeptiert).
- normale Entwicklung des Kindes: normale Gewichtszunahme,
keine ehemaligen Früh- oder Mangelgeborenen,
keine angeborenen Fehlbildungen,
keine chronischen Erkrankungen, auch kein klinisch manifestes Ekzem,
keine Medikamente (bis auf Fluor/Vitamin D).
- akut keine Infekte: kein Fieber und guter Allgemeinzustand in den letzten 2 Wochen vor der Untersuchung (geringe Zeichen von Luftwegsinfekten akzeptiert), ebenso keine Operationen oder größeren Verletzungen (sonst Verschiebung der Untersuchung, sofern möglich).
- DT-Impfungen (Diphtherie/Tetanus) entsprechend den Impfeempfehlungen (3 Impfungen, im Lauf der Studie aus pragmatischen Gründe reduziert auf mindestens 2 DT-Impfungen).
- Transport des Untersuchungsmaterials innerhalb von 4 Stunden ins Labor möglich.

3. Probanden-Rekrutierung

Insgesamt konnten 101 Mutter/Kind-Paare rekrutiert und untersucht werden. Einzelheiten hierzu finden sich in den folgenden Unterkapiteln. Weitere 32 Mutter/Kind-Paare konnten initial rekrutiert werden, die Untersuchung konnte aus verschiedenen Gründen dann aber doch nicht stattfinden: 16 Mütter zogen ihre Zusage später aus verschiedenen Gründen wieder zurück (z.B. doch Bedenken wegen der Blutentnahme), 10 Kinder konnten wegen im Zeitfenster bestehender Infekte bzw. einer kürzlich erfolgten Operation nicht untersucht werden (keine weitere Verschiebung mehr möglich), 3 Kinder hatten im Alter von 11 Monaten erst eine oder noch keine DT-Impfung erhalten. Bei 3 Kindern gelang die Blutentnahme nicht.

3.1 Nicht gestillte Kinder

Erwartungsgemäß schwierig war die Rekrutierung nicht gestillter Kinder, da inzwischen in allen Berliner Geburtskliniken die Mütter intensiv über die positiven Aspekte des Stillens informiert werden, und von den dennoch nicht stillenden Müttern der überwiegende Teil raucht. Zudem war die Motivierung der Eltern schwieriger, da die Kinder von der sogenannten Schadstoff-Problematik der Muttermilch nicht betroffen waren. Es wurden daher die unterschiedlichsten Möglichkeiten zur Rekrutierung genutzt. Insgesamt 11 Kinder konnten über eine der beiden Wöchnerinnen-Stationen des Virchow-Klinikums gefunden werden (auf der Station 37 wird dokumentiert, welche Mütter abgestillt hatten; diese Familien wurden angeschrieben und um Rückruf gebeten). Weitere 4 Kinder wurden über Zeitungsartikel bzw. -insetate rekrutiert (3 *Tagesspiegel*, 1 *BZ*), 4 Kinder über niedergelassene Kollegen/innen (Pädiatrie/Gynäkologie), 2 Kinder über Bekannte/andere Studienteilnehmer. Von diesen 21 Kindern waren 9 nicht und die anderen 12 mehr oder weniger stark Zigarettenrauch-exponiert.

3.2 Gestillte Kinder in Berlin

Die Rekrutierung der lange gestillten Kinder in Berlin gelang ohne Probleme über Zeitungsberichte zur Pressekonferenz am 12.8.1997 (*Tagesspiegel*, *BZ*, *Berliner Morgenpost*, *Neues Deutschland*) und Anzeigen im Lokalteil des *Tagesspiegels* (2.11.1997, 18.1.1998, 18.10.1998) und der *Berliner Zeitung* (4.7.1998). Um den PCDD/PCDF/PCB-Konzentrationsbereich bei den gestillten Kindern auch in Richtung niedrigerer Konzentrationen zu erweitern, wurden in Berlin in den letzten Monaten der Rekrutierungsphase vorwiegend Kinder mit erwarteter geringerer Dioxin-Exposition gesucht (Geschwister ebenfalls länger gestillt, jüngere Mütter).

Insgesamt wurden von den 51 lange gestillten Kindern aus Berlin und Umgebung (inklusive eines Kindes aus Zeitz) 42 über Zeitungen rekrutiert (32 *Tagesspiegel*, 4 *Berliner Zeitung*, 4 *Neues Deutschland*, 2 *Berliner Morgenpost*, 1 *BZ*). Weitere 3 Kinder wurden aus dem Kolleginnenkreis und weitere 6 Kinder über die Stillgruppe des Bezirksamtes Charlottenburg für die Untersuchung gewonnen werden.

3.3 Gestillte Kinder mit höherer PCDD/PCDF-Exposition

Die Suche nach Müttern mit relativ hohen PCDD/PCDF/PCB-Werten war erwartungsgemäß schwierig. Die ursprünglich geplante Einbeziehung von Müttern mit hohem Fischverzehr wurde nicht weiter verfolgt aufgrund des hohen organisatorischen Aufwandes und möglicher Confounder (Fischfette, Methyl-Quecksilber), die bei der Rekrutierung von nur wenigen Müttern schwer zu berücksichtigen sind. Ähnliche Probleme gab es bei der Suche nach Müttern, die 1976 bei dem Seveso-Unfall TCDD-exponiert wurden (in Zusammenarbeit mit Prof. Mocarelli, Universität Mailand, Italien) und bei der Suche nach Müttern mit relativ hoher PCDD/PCDF-Exposition durch Verzehr von Krebsen aus dem Frierfjord/Norwegen, bedingt durch die langjährigen Emissionen einer Magnesium-Fabrik (JAHANSEN et al., 1996, in Zusammenarbeit mit Dr. Becher, National Institute of Public Health, Oslo). Die Suche konzentrierte sich daher auf zwei Bereiche:

3.3.1 Untersuchungsämter der Länder

Bedingt durch den anhaltenden Abfall der Dioxin-Konzentrationen und die abgeebbte öffentliche Diskussion wurden in den letzten Jahren in den Landesuntersuchungsämtern in Oldenburg (Dr. Ende), Münster (Dr. Fürst) und Freiburg (Dr. Malisch) nur noch wenige Muttermilch-Untersuchungen durchgeführt. Bei einem Durchschnittswert von ca. 13 ppt (I-TEq/g Milchfett, I-TEq-Werte sind nur auf PCDD/Fs bezogen) in den Jahren 1997 und 1998 wurden Werte über 20 ppt als relativ hoch angesehen und die o.g. Institutionen um Mitteilung bzw. Information der Mutter über die Studie gebeten. Die höchste 1997 gemessene Konzentration lag mit 29 ppt unter dem Durchschnittswert von ca. 30 ppt in den westlichen Bundesländern von 1990. Diese Mutter kam aus Crailsheim/Baden-Württemberg (nahe der ehemaligen Kabelverschmelzanlage Maulach und dort aufgewachsen; WUTHE et al., 1992) und konnte in die Studie aufgenommen werden. 1998 wurde in Niedersachsen bei einer Mutter ein Wert von 25 ppt gemessen, die vom zuständigen Gesundheitsamt angesprochene Mutter meldete sich jedoch nicht für die Studie. Aus Berlin konnte eine Mutter rekrutiert werden nach einer im BgVV (Dr. Mathar) durchgeführten Muttermilch-Analyse, die einen aus der Anamnese nicht zu erklärenden Wert von 28 ppt ergab. Somit konnten auf diesem Weg nur 2 Mütter in die Studie aufgenommen werden.

3.3.2 Region Ilsenburg/Harz

Da POPs in Bezug auf die Hintergrundexposition vornehmlich über die Nahrung aufgenommen werden, die wiederum unter den derzeitigen Verhältnissen in der Bundesrepublik für die allermeisten Menschen vorwiegend von Supermarktketten (= weite Verteilung) bezogen wird, tragen lokale Quellen mit hoher PCDD/PCDF-Emission üblicherweise kaum zu einer Erhöhung der bei Anwohnern gemessenen PCDD/PCDF-Werte bei. Dies wie auch die zunehmende Mobilität der Menschen (kein lebenslanges Wohnen an einem Ort) und die lange Halbwertszeit der Verbindungen erklärt die bei Erwachsenen relativ geringe Streuung von gemessenen Konzentrationen im Hintergrundbereich.

Eine der wenigen Ausnahmen bildet die Region Ilseburg/Sachsen-Anhalt. Dort wurde bis 1990 eine Kupfer-Hütte (Erz-Verhüttung und Recycling-Ofen) ohne Filteranlage betrieben, die zu hoher lokaler Bodenkontamination führte. Dies wurde erst nach der Wende aufgedeckt und führte zur Stilllegung der Anlage. Muttermilch-Untersuchungen aus den Jahren 1990/1991 zeigten ca. doppelt so hohe I-TEq-Werte im Vergleich zu Müttern ohne bekannte besondere Exposition in den westlichen Bundesländern (Mittelwert 59, Min. 36, Max. 86 ppt bei 9 Proben, erhöhte Werte auch für HCB als Verbrennungsprodukt, ALDER et al. 1994). Dies ist durch die zu DDR-Zeiten geringere Mobilität, die teilweise Selbsterzeugung von Lebensmitteln in der ländlichen Region (z.B. eigene Hühner in Bodenhaltung) und die vorwiegend lokale Verteilung der erzeugten Lebensmittel erklärbar. Inwieweit sich durch die geänderten Lebensumstände und die Stilllegung der Kupferhütte die PCDD/PCDF-Konzentrationen bei Müttern in den letzten Jahren erniedrigt hatten, blieb zunächst unklar.

Zur Klärung dieser Frage wurden unter Vermittlung der beiden Kinderärztinnen in Ilseburg und Darlingerode von stillenden Müttern Milchproben gesammelt, die freundlicherweise von Dr. W. Mathar im BgVV analysiert wurden (ABRAHAM et al., 1998b). Die in insgesamt 16 Proben gemessenen PCDD/PCDF-Gehalte ergaben folgende Werte (geordnet nach Höhe): 81, 64, 52, 49, 47, 41, 33, 29, 28, 27, 25, 24, 22, 19, 16, 11 ppt (Mittelwert 36 ppt). Eingeschlossen waren nicht nur Mütter direkt aus Ilseburg, sondern auch aus den umliegenden Dörfern Drübeck, Darlingerode, Veckenstedt und Abbenrode. Die Mutter mit der niedrigsten Konzentration (11 ppt) war erst kürzlich aus Hessen in die Region gezogen. Insgesamt zeigte sich eine starke Abhängigkeit der Werte von der Zahl der in Ilseburg und Umgebung verbrachten Lebensjahre. Im Vergleich zu den Voruntersuchungen von 1990/91 waren die Werte im Mittel zwar abgefallen, einige Mütter hatten jedoch weiterhin relativ hohe Werte. Zu vermuten war eine anhaltende erhöhte Zufuhr über die Nahrung, insbesondere über Hühnereier aus Bodenhaltung. Tatsächlich fanden sich in solchen Eiern aus Ilseburg und Drübeck mit jeweils 16 ppt erhöhte Werte im Vergleich mit analysierten Eiern einer Supermarktkette von 3,8 ppt (Analyse: BgVV).

Weitere 10 Muttermilch-Analysen wurden freundlicherweise vom Lebensmitteluntersuchungsamt Oldenburg (Frau Dr. E. Bruns-Weller, Frau Dr. A. Knoll, Herr Dr. M. Ende) durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob eventuell auch in der ca. 10 km westlich in Niedersachsen gelegenen Region Bad Harzburg erhöhte Dioxin-Werte in der Muttermilch zu finden sind. Hinweise hierauf ergaben sich durch die Metallhütten in der Region (insbesondere Oker-Harlingerode, größtenteils Anfang der 80er Jahre geschlossen nach Bekanntwerden der heftigen Kontamination des Bodens mit Schwermetallen, aber auch mit Dioxinen). Zudem stellte sich die Frage einer eventuell generell höheren Dioxin-Kontamination im Harz als Folge der jahrhundertlang betriebenen Metallverhüttung. Die Ergebnisse dieser Muttermilch-Analysen ergaben jedoch keine grob auffälligen Werte: 22, 17, 17, 15, 13, 11, 10, 9, 9 und 8 pg I-TEq/g Milchfett (Mittelwert 13 pg I-TEq/g).

Als Konsequenz dieser Voruntersuchungen konzentrierte sich die Rekrutierung von höher PCDD/PCDF-exponierten Müttern auf die Stadt Ilseburg und die o.g. umliegenden Dörfer. Es wurden dabei auch Mütter angesprochen, bei denen eine Muttermilch-Untersuchung nicht mehr möglich war (Kind schon abgestillt). Insgesamt zeigte sich, daß durch die sozialen Veränderungen nach der Wende von 1989 auch in Ilseburg und Umgebung die Mobilität zugenommen hatte und somit relativ wenige Mütter zeitlebens nur an einem Ort gewohnt

hatten. Es wurden auch Mütter angesprochen, die erst relativ kurz in der Region wohnten und somit keine auffällig hohen PCDD/PCDF-Werte erwarten ließen. Dies geschah, um allen interessierten (und z.T. besorgten) Müttern die Gelegenheit zur Untersuchung zu geben. Ein weiterer Grund war, daß nicht ausgeschlossen werden konnte, daß allein der Faktor “Region Ilseburg” als Confounder (u.U. Ernährung, Klima oder soziale Verhältnisse anders als in Berlin) zu Veränderungen biologischer Parameter führt, die dann mit höheren PCDD/PCDF-Werten assoziiert sind.

Die Kontaktaufnahme mit den Müttern geschah überwiegend über die Kinderärztinnen und Kinderärzte vor Ort. Nach anfänglicher Zurückhaltung war die Stadtverwaltung Ilseburg bereit, die Rekrutierung von gestillten Kindern aus der Region durch die Überlassung der Adressen von Müttern zu unterstützen, die im entsprechenden Zeitraum in Ilseburg und den umliegenden Gemeinden Drübeck und Darlingerode ein Kind geboren hatten. Auf diese Weise konnten systematisch alle 63 Mütter angesprochen werden, deren Kinder zwischen Juni 1997 und März 1998 geboren wurden. Es zeigte sich hierbei, daß die ganz überwiegende Zahl der Mütter ihre Kinder deutlich kürzer als die für die Studie vorgesehene Mindestzeit von 4 Monaten voll gestillt hatte.

Bei den Müttern, die die Studienkriterien erfüllten, waren bis auf eine Ausnahme alle zu einer Teilnahme an der Studie bereit. Insgesamt konnten 27 Mutter/Kind-Paare rekrutiert und untersucht werden, davon 12 mit vorheriger Muttermilch-Analyse.

4. Das Studienkollektiv

4.1 Grundlegende Daten

Zwischen Juni 1997 und Mai 1999 wurden insgesamt 101 Mutter/Kind-Paare aus dem deutschen Sprachraum untersucht (jeweils eine Mutter und ein Vater stammten aus der Schweiz). 21 Kinder waren nicht gestillt worden (kürzer als 14 Tage), 80 Kinder lange gestillt, inklusive 27 aus der Region Ilseburg. Es wurden 51 Jungen und 50 Mädchen untersucht. Keines der Kinder wurde nachträglich von der Studie ausgeschlossen. Grundlegende anamnestiche Daten und Körpermaße sind in Tabelle 4a zusammengefaßt, zunächst getrennt für gestillte und nicht gestillte Kinder. Angegeben ist bei intervallskalierten Parametern der Mittelwert (mit Standardabweichung in Klammern), bei qualitativen Merkmalen die Häufigkeit (mit Prozentzahl in Klammern). Gruppenunterschiede wurden mit dem Mann-Whitney-Test bzw. dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz überprüft.

Entsprechend den Auswahlkriterien lag das Alter innerhalb einer 4-Wochen-Spanne zwischen 341 und 369 Tagen (11,2 und 12,1 Monaten), mit einem Mittelwert von 11,6 Monaten. Die Verteilung der Körpermaße bei der Untersuchung entsprach den Erwartungen für gesunde deutsche Kinder (alle Meßdaten zwischen der 3. und 97. Perzentile, bis auf ein gestilltes Mädchen mit einem Körpergewicht von 7,30 Kg im Alter von 11,4 Monaten etwas unterhalb der 3. Perzentile). Nicht gestillte Kinder waren durchschnittlich etwas schwerer (+350 g) und länger (+0,3 cm), hatten jedoch einen geringeren Kopfumfang (-0,6 cm). Nur die Differenz für den Kopfumfang erreichte Signifikanz-Niveau ($p < 0,05$), war jedoch schon bei der Geburt vorhanden (-0,6 cm, $p < 0,05$). Die nicht gestillten Kinder hatten im Durchschnitt eine um eine halbe Woche längere Schwangerschaftsdauer ($p < 0,05$; eingeschlossen waren nur reifgeborene Kinder entsprechend mindestens 37 vollendeten Schwangerschaftswochen). Weitere Daten vom Zeitpunkt der Geburt unterschieden sich nicht wesentlich.

Alle Kinder waren nach allgemeinen Kriterien gesund bis auf eine im Rahmen des üblichen liegende Zahl von banalen Luftwegsinfekten (maximal 10). Entsprechend den Auswahlkriterien mußten die Kinder in den letzten 2 Wochen in gutem Allgemeinzustand gewesen sein und durften kein Fieber gehabt haben. Minimale Zeichen von Luftwegsinfekten (z.B. leicht behinderte Nasenatmung, zweimaliges leichtes Husten während der Anwesenheit des Untersuchers von ca. 1,5 Stunden) waren erlaubt und nach strengen Kriterien bei ca. 40% der Kinder zu beobachten. Wie zu erwarten, war die Zahl der bisherigen Infekte im wesentlichen durch die Zahl der Geschwister im Kleinkindalter bedingt: im Median 3 Luftwegsinfekte ohne und 6 bei einem oder mehr Geschwistern im Kleinkindalter. Erst eine relativ geringe Zahl von 12 Kindern besuchte zum Zeitpunkt der Untersuchung bereits einen Kindergarten oder eine Tagesmutter. Hinsichtlich der bis dahin durchgemachten Infekte gab es keine signifikanten Gruppenunterschiede zwischen gestillten und nicht gestillten Kindern. Dies gilt auch für die bis dahin durchgeführten Impfungen, mit Ausnahme der Hepatitis B-Impfung, die gestillte Kinder im Durchschnitt weniger oft als nicht gestillte Kinder erhalten hatten (1,5x gegenüber 2,1x, $p < 0,01$).

Tabelle 4.a: Grundlegende Daten der Personen in den untersuchten Hauptgruppen. Angegeben sind Mittelwert (Standard-Abweichung) bzw. Häufigkeit (Prozentsatz). Gruppenunterschiede wurden mit dem Mann-Whitney bzw. dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz überprüft.

	nicht gestillte Kinder n=21	gestillte Kinder n=80	p
Kind			
Geschlecht: Mädchen	11/21 (52,4%)	39/80 (48,8%)	n.s.
Alter (Tage)	351 (6)	353 (8)	n.s.
Körpergewicht bei U. (kg)	9,71 (0,97)	9,36 (0,78)	n.s.
Körperlänge bei U. (cm)	75,4 (2,8)	75,1 (2,3)	n.s.
Kopfumfang bei U. (cm)	45,8 (0,9)	46,4 (1,2)	<0,05
BMI bei U. (kg/m2)	17,1 (1,4)	16,6 (1,2)	n.s.
erster Zahn mit (Monaten)	6,1 (1,9)	7,2 (1,8)	<0,05
Anzahl Zähne bei U.	5,9 (2,1)	5,4 (2,0)	n.s.
Gestationsalter (Wochen)	40,7 (1,0)	40,2 (1,0)	<0,05
Nabelarterien-pH	7,28 (0,09)	7,27 (0,08)	n.s.
Geburtsgewicht (kg)	3,51 (0,39)	3,52 (0,39)	n.s.
Geburtslänge (cm)	51,7 (2,2)	51,9 (2,1)	n.s.
Kopfumfang bei U2 (cm)	34,6 (1,1)	35,2 (1,2)	<0,05
Anzahl Geschwister insgesamt	0,67 (0,97)	0,56 (0,61)	n.s.
Anzahl Geschwister jünger 6 Jahre	0,29 (0,56)	0,39 (0,56)	n.s.
Krippe oder Tagesmutter bei U.	2/21 (9,5)	10/80 (12,5%)	n.s.
BCG-Impfung	3/21 (14,3%)	24/80 (30,0%)	n.s.
nur 2x DT-geimpft	1/21 (4,8%)	16/80 (20,0%)	n.s.
letzte DT-Impfung vor (Wochen)	23 (6)	23 (7)	n.s.
Anzahl Pertussis-Impfung	3,0 (0,0)	2,8 (0,7)	n.s.
Anzahl HiB-Impfung	2,7 (0,5)	2,6 (0,6)	n.s.
Anzahl Hepatitis B-Impfung	2,1 (0,5)	1,5 (0,9)	<0,01
erster Infekt mit (Monaten)	3,8 (2,1)	5,1 (2,7)	n.s.
Anzahl Infekte bisher	4,8 (2,2)	4,3 (2,3)	n.s.
Anzahl Infekte mit Fieber bisher	1,6 (1,1)	1,7 (1,4)	n.s.
jemals Otitis media	4/21 (19,0%)	18/80 (22,5%)	n.s.
jemals Pneumonie/schw. Bronchitis	2/21 (9,5%)	8/80 (10,0%)	n.s.
jemals Durchfallerkrankung	10/21 (47,6%)	23/80 (28,8%)	n.s.
jemals Antibiotikum	7/21 (33,3%)	24/80 (30,0%)	n.s.
3-Tage-Fieber gehabt	7/21 (33,3%)	18/80 (22,5%)	n.s.
Windpocken gehabt	1/21 (4,8%)	9/80 (11,3%)	n.s.
Mundsoor gehabt	7/21 (33,3)	29/80 (36,3)	n.s.
Windelsoor gehabt	8/21 (38,1)	39/80 (48,8)	n.s.
(fragl.) früher mal atop. Dermatitis	0/21 (0%)	20/80 (25,0%)	<0,05

Tabelle 4a (Fortsetzung)

	nicht gestillte Kinder n=21	gestillte Kinder n=80	p
leichte atopische Dermatitis bei U.	0/21 (0%)	5/80 (6,3)	n.s.
minimale Infektzeichen bei U.	8/21 (38,1%)	34/80 (42,5%)	n.s.
Mutter			
Alter (Jahre)	30,6 (5,6)	31,7 (3,8)	n.s.
Körpergewicht (kg)	64,1 (13,8)	62,4 (8,9)	n.s.
Körperlänge (cm)	166 (7)	169 (6)	<0,05
BMI (kg/m ²)	23,2 (4,2)	21,8 (2,9)	n.s.
Fleischkonsum (Mahlz. pro Woche)	3,3 (1,5)	2,1 (1,1)	<0,01
Fischkonsum (Mahlz. pro Monat)	1,8 (1,5)	2,3 (1,3)	n.s.
Atopie angegeben	9/21 (42,9%)	28/80 (35,0%)	n.s.
Schulbesuch (Jahre)	10,0 (1,4)	12,0 (1,4)	<0,001
keine abgeschl. Berufsausbildung	5/21 (23,8%)	1*/80 (1,3%)	<0,001
abgeschl. Hochschulstudium	0/21 (0%)	37/80 (46,3%)	<0,001
arbeitet (zeitweise) wieder	1/21 (4,8%)	26/80 (32,5%)	<0,05
in DDR geboren	5/21 (23,8%)	33/80 (41,3%)	n.s.
Vater			
Körpergewicht (kg)	81,2 (11,0)	80,5 (12,2)	n.s.
Körperlänge (cm)	181 (8)	181 (8)	n.s.
BMI bei U. (kg/m ²)	24,7 (2,5)	24,6 (3,1)	n.s.
Atopie angegeben	4/21 (19,0%)	21/80 (26,3%)	n.s.
Schulbesuch (Jahre)	10,7 (1,7)	12,0 (1,4)	<0,001
keine abgeschl. Berufsausbildung	3/21 (14,3%)	0/80 (0%)	<0,01
abgeschl. Hochschulstudium	3/21 (14,3%)	47/80 (58,8%)	<0,001
wöchentliche Arbeitszeit (Stunden)	29,5 (17,2)	37,9 (7,9)	<0,01
arbeitslos oder arbeitet nicht	4/21 (19,0%)	2**/80 (2,5%)	<0,01
Wohnungsgröße (m ²)	80 (28)	100 (28)	<0,01

* Mutter studiert noch, ** beide Väter "Hausmann"

Kinder mit chronischen Erkrankungen waren von der Untersuchung ausgeschlossen. Eine Ausnahme wurde für ein Kind gemacht, daß im Alter von 9 Monaten einen Diabetes mellitus entwickelt hatte. Unter der Insulin-Therapie hatte es in den letzten Wochen keine Probleme gegeben, zum Zeitpunkt der Untersuchung erhielt das Kind je 2 Einheiten Depot-Insulin morgens und abends, der Hb_{A1c}-Wert lag im Normbereich (d.h. gute längerfristige medikamentöse Einstellung). Fünf der untersuchten Kinder hatten leichte Zeichen einer atopischen Dermatitis mit geringer Ausdehnung und wurden deshalb ebenfalls nicht von der Studie ausgeschlossen. Insgesamt wurden bei 20 Kindern früher bestehende Hautveränderungen angegeben, die vermutlich einer leichten atopischen Dermatitis

entsprochen haben (erstaunlicherweise ausschließlich bei den gestillten Kindern, $p < 0,05$). Weitere durchgemachte Erkrankungen bzw. Auffälligkeiten (außer banalen Infekten) waren: Neugeborenenkrämpfe ($n=1$), Neugeboreneninfektion ($n=1$), postnatale Anämie durch Hämolyse unklarer Genese ($n=1$), Fieberkrampf ($n=1$), obstruktive Bronchitis ($n=3$), sonografisch kleine Niere links ($n=1$). Ein Kind war nach einem Beinbruch operiert worden, ein weiteres nach einem Leistenbruch.

Bis auf zwei Kinder hatten alle mehr oder weniger regelmäßig die Fluor/Vitamin D-Prophylaxe erhalten, ein Kind hatte Eisentropfen verordnet bekommen. Bei nicht gestillten Kindern waren die ersten Zähne signifikant früher durchgebrochen ($-0,9$ Monate, $p < 0,05$), zum Zeitpunkt der Untersuchung waren bei ihnen durchschnittlich 0,5 Zähne mehr durchgebrochen (n.s.).

Grundlegende Daten der Eltern der untersuchten Kinder sind ebenfalls in Tabelle 4a angegeben. Die Mütter unterschieden sich von den Körpermaßen her signifikant bei der Körperlänge (-3 cm bei den nicht stillenden, $p < 0,05$), was vermutlich zufallsbedingt ist. Diese Mütter aßen im Vergleich zu Müttern gestillter Kinder häufiger Fleisch ($+1,2$ Mahlzeiten pro Woche, $p < 0,01$) und seltener Fisch ($-0,5$ Mahlzeiten pro Monat, n.s.). Keine signifikanten Differenzen gab es hinsichtlich der anamnestischen Häufigkeit von Erkrankungen aus dem atopischen Formenkreis. Wie erwartet gab es teilweise erhebliche Unterschiede bei der Wohnungsgröße und bei beiden Elternteilen bezüglich der Schul-/Berufsausbildung und Beschäftigung.

4.2 Nicht gestillte Kinder

Bei den 21 “nicht” gestillten Kindern waren 11 (52,4%) gar nicht gestillt worden, die 10 anderen Kinder zwischen 1 und 14 Tagen (durchschnittliche Stilldauer in der Gesamtgruppe: 3,1 Tage). Insgesamt 12 dieser Kinder waren mehr oder weniger stark passiv Zigarettenrauch-exponiert (im Gegensatz zu 9 nicht exponierten, nicht gestillten Kindern und zu allen gestillten Kindern). Ein Vergleich dieser relativ kleinen Untergruppen bei den nicht gestillten Kindern bezüglich aller in Tabelle 4a gelisteter Parameter zeigte keine signifikanten Unterschiede bis auf eine im Durchschnitt bessere Ausbildung der Väter nicht Zigarettenrauch-exponierter Kinder (Mittelwert Anzahl der Schuljahre 11,8 zu 9,8, $p < 0,05$; abgeschlossenes Hochschulstudium bei 3/9 im Vergleich zu 0/12, $p < 0,05$).

4.3 Gestillte Kinder

Die 80 lange gestillten Kinder waren entsprechend den Auswahlkriterien mindestens 4 Monate gestillt worden (inklusive der anteilmäßigen Anrechnung von Teilstillzeiten: 2 Kinder waren nur 3,0 bzw. 3,2 Monate voll gestillt worden, alle anderen waren mindestens 4,0 Monate voll gestillt worden). 30 Kinder (37,5% der gestillten) waren genau sechs Monate voll gestillt worden, 8 länger als 6 Monate (maximal 10,8 Monate). 29 Kinder wurden zum Zeitpunkt der Untersuchung noch teilgestillt (18 mit einer, 9 mit zwei, 2 mit drei Mahlzeiten). Durchschnittlich betrug die Vollstillzeit 5,5 Monate (= Median) und die Zeit bis zum Abstillen 9,3 Monate (Median 9,0 Monate). Als Abschätzung für den Gesamt-Milchfett-Transfer von der Mutter auf das Kind wurde aus den Angaben, zu welchem Zeitpunkt jeweils

Stillmahlzeiten durch andere Mahlzeiten ersetzt wurden, die äquivalente Vollstillzeit berechnet (z.B. wurden 2 Monate mit 3 Stillmahlzeiten und 3 anderen Mahlzeiten als 1 Monat äquivalente Vollstillzeit gerechnet). Dieser Wert lag durchschnittlich bei 7,4 Monaten (=Median, Minimum 3,6 Monate, Maximum 11,1 Monate). Befragt nach ihrer Gewichtsentwicklung während des Stillens, gaben 57 Mütter an, auch über die ersten Wochen nach der Entbindung hinaus noch Gewicht abgenommen zu haben (durchschnittlich -4,0 kg). 19 Mütter hatten keine Gewichtsveränderung bemerkt, 4 Mütter gaben eine Gewichtszunahme an (durchschnittlich +5,3 kg).

36 Mütter (45% der stillenden) hatten bereits mindestens ein weiteres Kind gestillt, im Mittel mit einer äquivalenten Vollstilldauer von 7,3 Monaten (Minimum 1,8 Monate, Maximum 18,5 Monate).

Ein Vergleich der gestillten Kinder aus der Region Ilsenburg und Berlin (inklusive der Kinder aus Crailsheim und Zeitz, = "Berlin+") hinsichtlich der Stillanamnese ist in Tabelle 4b zusammengestellt. Die Ilsenburger Kinder waren signifikant kürzer gestillt, sowohl die Vollstilldauer, die äquivalente Vollstilldauer als auch die Zeit bis zum Abstillen betreffend. Ebenfalls in dieser Tabelle gelistet sind alle Parameter der Tabelle 4a, bei denen signifikante Gruppenunterschiede zwischen Ilsenburgern und Berliner Kindern gefunden wurden, sowie Parameter, die aus grundsätzlichen Überlegungen interessant sind.

Erwartungsgemäß waren prozentual wesentlich mehr Kinder in der Region Ilsenburg bei Geburt gegen Tuberkulose (BCG) geimpft worden, da diese Impfung bis zum Frühjahr 1998 in den neuen Bundesländern empfohlen wurde. Überraschenderweise gaben die Eltern aus der Region Ilsenburg deutlich häufiger an, daß das Kind bereits eine Mittelohrentzündung (Otitis media, $p<0,05$) oder eine Lungenentzündung bzw. schwere Bronchitis ($p<0,01$) gehabt hatte. Entsprechend hatten die Ilsenburger Kinder deutlich häufiger Antibiotika erhalten ($p<0,01$). Bei der Interpretation dieser Befunde ist zu berücksichtigen, daß die Diagnose "Lungenentzündung" ohne Röntgenbild eine erhebliche Unsicherheit beinhaltet (kein Kind war so schwer erkrankt, daß eine stationäre Behandlung erforderlich gewesen wäre). Auch die Frage, wann eine Mittelohrentzündung eitrig ist und unter welchen Umständen eine antibiotische Behandlung indiziert ist, ist stark von grundsätzlichen Einstellungen des jeweiligen Kinderarztes abhängig. In Ilsenburg war die überwiegende Zahl der Kinder in Behandlung einer Kinderärztin, so daß hierdurch ein Bias gegeben war.

Signifikante Unterschiede gab es ebenfalls bei den Angaben der Mutter zu ihrer Ernährung: die Ilsenburger aßen durchschnittlich 0,4 Fleischmahlzeiten mehr pro Woche ($p<0,05$) und 0,7 Fischmahlzeiten weniger pro Monat ($p<0,05$).

Hochsignifikant unterschiedlich bei Müttern und Vätern war die Anzahl der absolvierten Schuljahre: In der Region Ilsenburg hatten Eltern überwiegend den DDR-Standardabschluß 10. Klasse absolviert, entsprechend weniger häufig als bei der Berliner Untergruppe hatten Eltern studiert. Hierbei ist zu berücksichtigen, daß in Ilsenburg und Umgebung alle Mütter angesprochen wurden und auch tatsächlich an der Studie teilnahmen, die länger als 4 Monate gestillt hatten. Somit entspricht das Ilsenburger Kollektiv sozial vermutlich einem besseren Durchschnitt einer eher ländlichen Region in den neuen Bundesländern (z.B. gab es bei allgemein in der Region sehr hoher Arbeitslosigkeit keine Familie, in der beide Elternteile arbeitslos waren). Bei der Berliner Untergruppe (gestillte Kinder) ist zu berücksichtigen, daß

durch die überwiegende Rekrutierung über Zeitungen, bei der sich die Eltern von sich aus melden mußten, der Anteil hochgebildeter Menschen mit Interesse an Umweltthemen besonders groß ist. In dieser Gruppe fand sich im Vergleich zum Durchschnitt sicher auch ein höherer Anteil von Eltern, die auf gesunde Ernährung Wert legten und entsprechend gewissen Trends weniger Fleisch und mehr Fisch aßen (s.o.).

Tabelle 4.b: Grundlegende Daten der Personen in den untersuchten Hauptgruppen bei den gestillten Kindern. Angegeben sind Mittelwert (Standard-Abweichung) bzw. Häufigkeit (Prozentsatz). Gruppen-unterschiede wurden mit dem Mann-Whitney bzw. dem Chi-Quadrat-Test auf Signifikanz überprüft. Berlin+: inklusive der Kinder aus Zeitz und Crailsheim.

	Ilseburg n=27	Berlin + n=53	p
Vollstilldauer (Monate)	5,2 (1,5)	5,6 (0,7)	<0,01
6 Monate oder länger gestillt	8/27 (29,6%)	30/53 (56,6%)	<0,05
abgestillt mit (Monaten)	8,1 (2,5)	9,9 (1,8)	<0,01
noch teilgestillt bei U.	6/27 (22,2%)	23/53 (43,4%)	n.s.
äquivalente Vollstilldauer (Monate)	6,6 (1,8)	7,8 (1,2)	<0,01
Geschwister gestillt	13/27 (48,1%)	23/53 (43,4%)	n.s.
äquiv. Vollstilldauer Geschw. (Mo.)	4,8 (2,2)	8,7 (4,1)	<0,01
Kind			
Geschlecht: Mädchen	10/27 (37,0%)	29/53 (54,7%)	n.s.
Körpergewicht bei U. (kg)	9,48 (0,65)	9,30 (0,84)	n.s.
Körperlänge bei U. (cm)	75,4 (2,4)	75,0 (2,3)	n.s.
Kopfumfang bei U. (cm)	46,3 (1,3)	46,5 (1,2)	n.s.
BMI bei U. (kg/m ²)	16,7 (1,2)	16,5 (1,2)	n.s.
Krippe oder Tagesmutter bei U.	2/27 (7,4%)	8/53 (15,1%)	n.s.
BCG-Impfung	18/27 (66,7%)	6/53 (11,3%)	<0,001
Anzahl Infekte bisher	3,9 (2,1)	4,5 (2,4)	n.s.
Anzahl Infekte mit Fieber bisher	2,0 (1,4)	1,6 (1,4)	n.s.
jemals Otitis media	10/27 (37,0%)	8/53 (15,1%)	<0,05
jemals Pneumonie/schw. Bronchitis	6/27 (22,2%)	2/53 (3,8%)	<0,01
jemals Durchfallerkrankung	4/27 (14,8%)	19/53 (35,8%)	<0,05
jemals Antibiotikum	14/27 (51,9%)	10/53 (18,9%)	<0,01
(fragl.) früher mal atop. Dermatitis	9/27 (33,3%)	11/53 (20,8%)	n.s.
leichte atopische Dermatitis bei U.	1/27 (3,7%)	4/53 (7,5%)	n.s.
minimale Infektzeichen bei U.	9/27 (33,3%)	25/53 (47,2%)	n.s.

Tabelle 4b (Fortsetzung)

	Ilseburg n=27	Berlin + n=53	p
Mutter			
Alter (Jahre)	29,5 (3,8)	32,8 (3,3)	<0,001
Fleischkonsum (Mahlz. pro Woche)	2,4 (0,9)	2,0 (1,1)	<0,05
Fischkonsum (Mahlz. pro Monat)	1,8 (1,1)	2,5 (1,4)	<0,05
Schulbesuch (Jahre)	10,8 (1,3)	12,5 (1,1)	<0,001
abgeschl. Hochschulstudium	5/27 (18,5%)	32/53 (60,4%)	<0,001
arbeitet (zeitweise) wieder	9/27 (33,3%)	17/53 (32,1%)	n.s.
in DDR geboren	24/27 (88,9%)	9/53 (17,0%)	<0,001
Vater			
Schulbesuch (Jahre)	10,9 (1,4)	12,6 (1,1)	<0,001
abgeschl. Hochschulstudium	8/27 (29,6%)	39/53 (73,6%)	<0,001
Wohnungsgröße (m ²)	91 (28)	104 (27)	n.s.

5. Untersuchungsmethoden

5.1 Blutentnahme

Die Blutentnahme bei den Studienkindern mußte besonderen Kriterien gerecht werden: das nötige Blutvolumen war mit 15 ml relativ groß, die Kinder sollten nüchtern (POP-Bezug auf Blutfette) und vor und während der Blutentnahme möglichst nicht unruhig sein oder schreien (kein Streß für Kind und Eltern, Vermeiden einer Streßleukozytose). Dazu erwies sich folgendes Vorgehen als günstig: Blutentnahme in der Wohnung, Ankunft des Untersuchers möglichst zur Aufwachzeit des Kindes, Kleben des “Emla”-Pflasters (Lokalanästhetikum) auf beide Handrücken. In der erforderlichen Wartezeit von ca. 45 Minuten Kleben eines Urinbeutels, körperliche Untersuchung des Kindes inklusive Messen und Wiegen, Interview mit den Eltern (anamnestische Angaben zur eigenen Krankheitsgeschichte, Expositions-Situation und Schwangerschaft sowie zur Geburt und bisherigen Entwicklung des Kindes), Blutentnahme dann parallel mit dem Frühstück (Ablenkung des Kindes, das in diesem Alter in der Regel durch das Festhalten der Hand für längere Zeit am meisten gestört wird). Mit diesem Vorgehen waren 58 Kinder ganz ruhig, 30 Kinder waren zeitweise unruhig (ließen sich aber z.B. bewegen, ihre Flasche weiterzutrinken), und nur bei 13 Kindern konnte ein längeres Schreien während der Blutentnahme nicht vermieden werden. Obwohl die Blutentnahme nur wenige Minuten (maximal ca. 10 Minuten) dauerte, zeigten sich bei den schreienden Kindern im Durchschnitt höhere Leukozyten-Werte (Streßleukozytose, siehe 6.2.1.).

Den Kindern wurde jeweils ca. 15 ml Heparin-Blut entnommen sowie 0,5 ml EDTA-Blut. Gewonnener Urin wurde sofort aliquotiert eingefroren. Der Mutter wurden ebenfalls in nüchternem Zustand ca. 40 ml Heparinblut abgenommen sowie 2 ml EDTA-Blut.

5.1.1 Wiederholungs-Untersuchungen

Obwohl ursprünglich nicht geplant, wurde bei insgesamt 36 Kindern eine 2. Blutuntersuchung (ca. 7 ml) durchgeführt, vorwiegend zur Überprüfung auffälliger Laborergebnisse. Dies geschah im Mittel 29,8 Tage (Median 28 Tage) nach der ersten Blutentnahme (Minimum 12 Tage, Maximum 73 Tage). Häufigster Grund war eine Erhöhung der Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase im Plasma (über 700 U/l), die sich bei 14 Kindern bei der ersten Blutentnahme fand. Die Wiederholungs-Untersuchungen wurden genutzt, um möglichst das gesamte Untersuchungsprogramm (bis auf POP- und Schwermetall-Analysen) zu wiederholen, so daß für die untersuchten biologischen Parameter die intraindividuelle Variation innerhalb weniger Wochen ermittelt werden konnte.

5.2 Der ¹³C-Koffein-Atemtest

Die durch Fremdstoffe induzierbare, Ah-Rezeptor-vermittelte Synthese von Zytochrom P450 1A2 (CYP1A2) sollte mit Koffein als spezifischem Substrat mit Hilfe des ¹³C-Atemtests gemessen werden. Dabei wird 3-methyl-¹³C-Koffein (Isotopenanreicherung 99% nach Angaben des Herstellers Cambridge Isotope Laboratories, USA) in einer Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht in nüchternem Zustand oral appliziert. In den folgenden 2 bis 4 Stunden werden in regelmäßigen Abständen über eine Maske Ausatemproben gesammelt, deren ¹³C-CO₂-Gehalte mittels Gas-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie gemessen werden. Die Ergebnisse können z.B. als Prozentsatz der kumulativen ¹³C-Exhalation über 2 Stunden ausgewertet werden. Dieser Parameter wird üblicherweise als Indikator der CYP1A2 vermittelten Koffein-Demethylierung gewählt.

5.3 Labormethoden

5.3.1 EDTA-Blut

Aus dem abgenommenen *EDTA-Blut* (0,5 ml) wurden ein maschinelles Blutbild angefertigt, die Retikulozytenzahl bestimmt sowie Ausstrichpräparate für die manuelle Zelldifferenzierung hergestellt. Im Institut für Molekularbiologie und Biochemie der Freien Universität Berlin (Dr. Wanner) wurde das Interesse an einer Bestimmung des Ah-Rezeptor-Polymorphismus geäußert. Hierfür konnte das restliche EDTA-Blut von den ersten 32 Kindern und deren Müttern zur Verfügung gestellt werden.

5.3.2 Heparin-Vollblut

Vom *Heparin-Blut* (15 ml) wurden zunächst als Vollblut abgenommen:

- 1,3 ml für die Bestimmung der *Schwermetalle* (Blei, Kadmium, Quecksilber), die zusätzlich ins Programm aufgenommen werden konnte (möglicher Confounder, insbesondere für die u.U. auch mit Schwermetallen höher belastete Region Ilseburg). Das Material wurde ebenso wie eine entsprechende Probe von der Mutter eingefroren, die Bestimmungen erfolgten nach Ende der Untersuchungsphase im Umweltbundesamt (Dr. Krause) nach üblichen Verfahren (Atomabsorption).
- 1,5 ml für die *Lymphozyten-Proliferation*: Vollblut-Methode, 1+7 Verdünnung mit serumfreiem Kulturmedium (AIM V), auf 96-well-Platte mit 100 µl Blutverdünnung plus 100 µl Stimulans in AIM V pro well. Kultur (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) über 3 Tage mit Phytohämagglutinin (PHA), Concanavalin A (ConA), Poke Weed Mitogen (PWM), Interleukin 2 (IL-2) und Anti-CD3, und über 5 Tage mit Tetanus- und Diphtherie-Toxoid, Staphylokokken-Enterotoxin B (SEB), Tuberkulin- und Candida-Antigen (jeweils Triplets mit 3 unterschiedlichen Konzentrationen und 12 wells Medium-Kontrolle). Am Ende der Kulturzeit jeweils 6-Stunden-Puls (1 µCi pro well) mit ³H-Thymidin (Fa. Amersham, 5

Ci/mmol), danach Einfrieren der Platten bei -18°C. “Ernten” mit automatischem Zell-Harvester innerhalb von wenigen Tagen, Messung der Proben im β -Counter nach Überführen der Filterplättchen in Röhrchen und Zugabe von 2 ml Szintillationscocktail. Mit dem beschriebenen Verfahren war die interindividuelle Streuung insbesondere bei den Lektinen erstaunlich gering, so daß die Zuverlässigkeit der Methode als hoch für einen Proliferations-Assay anzusehen ist. Auf den ursprünglich geplanten Intrakutantest (Multitest Merieux) zur Funktionsuntersuchung des Immunsystems wurde daher verzichtet, zumal dieser zahlreiche Nachteile hat (schmerzhaft beim Anlegen, Abhängigkeit des Ergebnisses von der Eindringtiefe bzw. der Hautbeschaffenheit, erforderlicher erneuter Besuch beim Kind nach 2 Tagen zum Ablesen).

- 1,0 ml für Lymphozyten-Oberflächenmarker: 3-fach-Kombinationen in den Fluoreszenzfarben PerCp, PE und FITC, Einsatz von jeweils 25 μ l Vollblut, nach 15-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur Lyse der Erythrozyten (Ortho-Lyse, 10 Min.) und Waschen der Zellen. Messung von 50 000 Leukozyten pro Kombination am Durchflußzytometer (Becton Dickinson). Das Gerät wurde für jedes Kind neu eingestellt (Verstärkung und Kompensation), die Messungen wurden nur von einer Person durchgeführt. Ursprünglich wurden 37 Kombinationen (inklusive von 5 Ansätzen für die Einstellung des Durchflußzytometers). Bei einem Teil der Ansätze stellte sich im Lauf des Projektes heraus, daß über die Zeit keine ausreichende Methoden-Stabilität zu gewährleisten war. So zeigte sich insbesondere bei einigen Aktivierungsmarkern (“positive” Zellen ab einer bestimmten Fluoreszenz-Stärke), daß offensichtlich die Fluoreszenz auch innerhalb der angegebenen Haltbarkeit abnahm (statistisch signifikanter Abfall mit fortlaufender Untersuchungsnummer). Bei einem weiteren Teil der Kombinationen zeigte sich nur eine geringe interindividuelle Variation, so daß eine Korrelationsanalyse mit den POPs keinen Sinn machte. Statistisch ausgewertet wurden die folgenden Kombinationen:

Fluor.Farbe	PerCp	PE	FITC
	CD2	TCR $\gamma\delta$	TCR $\alpha\beta$
	CD3	CD56	CD16
	CD4	CD8	CD3
	CD4	CD25	CD8
	CD4	CD26	CD8
	CD4	CD27	CD8
	CD4	CD8	CD62L
	CD4	CD8	HLA-DR
	CD4	CD28	CD29
	CD4	CD49d	CD29
	CD4	CD45R0	CD29
	CD4	CD45R0	CD11a
	CD4	CD45R0	CD45RA
	CD8	CD45R0	CD45RA
	CD8	CD11b	CD11a
	CD8	CD56	CD57
	CD8	CD49d	CD29
	CD19	CD23	CD21

- 0,25 ml für Lymphozyten-Oberflächenmarker nach 4 Stunden Inkubation mit PHA (5 µg/ml) zur Messung der Lymphozyten-Aktivierbarkeit (CD69 u.a.). Im Lauf des Projektes stellte sich heraus, daß die Zeit zwischen Blutentnahme und Eintreffen im Labor (maximal 4 Stunden) bereits einen Einfluß auf die Ergebnisse hat (geringere Aktivierbarkeit). Die Werte wurden daher nicht für Korrelationsanalysen mit POPs benutzt.

5.3.3 Heparin-Plasma

Das verbleibende Heparinblut wurde zentrifugiert (15 Min, 700 g), das *Plasma* danach abpipettiert zur Durchführung der folgenden Bestimmungen aus:

- 0,3 ml: C-reaktives Protein (CrP, Routinemethode), Immunglobuline (IgG, IgA, IgM) und Parameter der klinischen Chemie: Elektrolyte, Kreatinin, Cholesterin, Triglyceride, Gesamteiweiß, Albumin, AST (GOT), ALT (GPT), γ -GT, Gesamtbilirubin, Alkalische Phosphatase (AP), Laktatdehydrogenase (LDH), Eisen, freies Hämoglobin, Glukose. Die Messungen erfolgten auf Autoanalysern im Programm der klinischen Routine des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Prof. Köttgen).
- 1,9 ml wurden aliquotiert eingefroren bei -80°C zur Bestimmung nach Abschluß der Untersuchungsphase: IgG-Subklassen (turbidimetrische Messung, Firma The Binding Site), IgE (Elisa-Technik, Firma Pharmacia), spezifische Tetanus- und HiB-Antikörper (Elisa-Kit, Firma The Binding Site), löslicher Transferrin-Rezeptor (Elisa-Kit der Firma Orion Diagnostica), Transferrin (Autoanalyser, Methode der klinischen Routine), Schilddrüsen-Parameter (T3, T4, fT4, TSH, TBG, Fluoro-Immunoassay der Firma Wallac), Vitamine A und E, Carotinoide (HPLC-Technik, durchgeführt im Labor von Prof. Schweigert, Institut für Ernährungswissenschaft, Universität Potsdam), CrP mit ultrasensitiver Methode (Quantex CRP plus Latex, modifizierter immun-turbidimetrischer Assay der Firma Biokit).
- das verbleibende Plasma (3 - 5 ml) wurde zur Bestimmung der persistenten Chlorkohlenwasserstoffe benutzt (s. 5.3.6.).

5.3.4 PBMCs und Granulozyten

Nach dem Abzentrifugieren des Plasmas wurde das Restmaterial (Buffy coat und Erythrozyten) mit Kulturmedium verdünnt. Über einen Ficoll-Gradienten (15 Min., 700 g) wurden anschließend die *mononukleären Zellen (PBMCs)* isoliert und gewaschen. Ein Teil der Zellen wurden eingesetzt (3×10^6 in je 1 ml Kulturmedium mit einer Konzentration von 10 µg PHA/ml bzw. nur Medium) zur Gewinnung der Kulturüberstände nach 48 Std. im Brutschrank (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit). Das Material wurde bei -80°C eingefroren zur späteren Messung der *Zytokin-Produktion* (IL-5, IL-10, γ -Interferon), die mit ELISA-Kits der Firma Pharmingen durchgeführt wurde.

Zudem wurde aus den PBMCs ein Assay zur Bestimmung der Aktivität der Natural Killer (NK)-Zellen gegenüber K562-Zellen als Zielzellen durchgeführt (Inkubation über 2 Stunden, Messung der Lyse am Durchflußzytometer der Fa. Becton Dickinson). Diese Bestimmungen sind Teil der sich in Arbeit befindlichen Promotionsarbeit von Ralf Hussein.

Die restlichen PBMCs (10×10^6 pro ml) wurden kryokonserviert, indem sie nach 1:1 Zugabe von Einfriermedium (80% FCS, 20% DMSO) bei -80°C eingefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff überführt wurden. Aus dem Material ist die m-RNA-Bestimmung von Cytochrom P450 1B1 (CYP1A1, CYP1B1) mittels semiquantitativer PT-PCR vorgesehen. Durch diese Bestimmung soll die Frage nach einer eventuellen Induktion des Zytochrom P450-Systems als Folge der Dioxin-Exposition beantwortet werden. Die ursprünglich hierfür vorgesehene Durchführung des ^{13}C -Koffein-Atemtests stellte sich leider nach Untersuchung der ersten Kinder als zumindest für diese Altersstufe ungeeignet heraus (s. 6.1.). Das Verfahren zur Messung spezifischer m-RNA ist am Institut für Klinische Pharmakologie der Charité (PD Dr. Brockmöller, Prof. Roots) etabliert. Bei den ersten Untersuchungen traten jedoch Probleme auf (sehr schwaches Signal auf neuem Meßgerät), auch zeigten sich die ersten Ergebnisse der Analysen von 2 hoch-TCDD-belasteten Personen aus Wien (ABRAHAM et al., 1999) als zunächst nicht reproduzierbar. Es wurden daher zunächst die Wiener Proben zur Kontroll-Untersuchung zu Prof. Mocarelli (Mailand) geschickt, der in den letzten Jahren in Zusammenarbeit mit der amerikanischen Arbeitsgruppe von Prof. Lucier (NIEHS, Research Triangle Park) diese Technik zur Untersuchung der Seveso-Opfer in seinem Labor etabliert hat. Die kürzlich mitgeteilten Ergebnisse konnten tatsächlich die Induktion auf m-RNA-Ebene für CYP1A1 und CYP1B1 bestätigen. Allerdings scheint es intraindividuell relativ große Variationen zu geben. Zudem ist die Störanfälligkeit der Methode groß, wie auch der jüngste Bericht der genannten amerikanischen Arbeitsgruppe zeigt (Landi et al., 1999). Dennoch erscheint die Untersuchung der PBMC-Proben so interessant, um sie wenigstens von den höchst- und niedrigst-PCDD/PCDF-exponierten Kindern durchzuführen. Ob dies in Berlin oder Mailand geschehen wird, muß noch geklärt werden.

Nach der Ficoll-Separation wurde das restliche Material (Granulozyten und Erythrozyten) gewaschen, über einen Percoll-Gradienten (Dichte 1,076 und 1,095, 15 Min., 700 g) wurden anschließend die *Granulozyten* isoliert. Die verunreinigenden Erythrozyten wurden lysiert, die Zellen gewaschen und auf eine Zahl von 5×10^6 pro ml eingestellt. Die Phagozytose- und Burst-Aktivität der Granulozyten wurde durch Messung der Chemilumineszenz über 40 Minuten in einem Luminometer bestimmt (mit dem Bakterienwand-Bestandteil Zymosan, das zuvor mittels gepooltem Plasma bzw. Probanden-Plasma opsoniert wurde).

5.3.5 Weitere Methoden

Von jedem Kind wurden mindestens 10 ml Urin aliquotiert tiefgefroren für Bestimmungen nach Abschluß der Untersuchungsphase: Kotinin (Quantifizierung der passiven Exposition gegenüber Zigarettenrauch, Messung mittels HPLC-Verfahren), Jod-Ausscheidung (möglicher Einflußfaktor für Schilddrüsenhormone, Bestimmung im Labor von Herrn Prof. Willgerodt, Universitätskinderklinik Leipzig) sowie Schwermetall-Ausscheidung (Quecksilber, Cadmium, Arsen; Bestimmung bei Herrn Dr. Krause im Umweltbundesamt).

Asserviert wurden ferner 10 ml Trinkwasser zur Bestimmung von Nitrat und Nitrit (Streifentest Firma Merck) sowie ein Staubsaugerbeutel zur eventuellen Bestimmung der Innenraumbelastung.

Aus dem der Mutter abgenommenen EDTA-Blut wurde ein maschinelles Blutbild angefertigt. Vom Heparin-Blut wurden 2,0 ml abgenommen zur Schwermetall-Analyse (s.o.), das

restliche Material wurde zentrifugiert, um aus dem Plasma Triglyceride und Cholesterin zu bestimmen. Der überwiegende Teil des Plasmas (ca. 18 ml) wurde für die Dioxin-Analytik eingefroren.

5.3.6 POP-Analytik (O. Pöpke, ERGO Forschungsgesellschaft)

Wie geplant wurde zur Bestimmung von PCDDs, PCDFs, PCBs und anderen persistenten Chlorkohlenwasserstoffen (CKWs) ein Werkvertrag mit der ERGO Forschungsgesellschaft geschlossen. Konkret wurden die Proben auf folgenden 37 Verbindungen hin analysiert:

- 2378-substituierte PCDDs (2378-T4CDD, 12378-P5CDD, 123478-H6CDD, 123678-H6CDD, 123789-H6CDD, 1234678-H7CDD, OCDD),
- 2378-substituierte PCDFs (2378-T4CDF, 12378-P5CDF, 23478-P5CDF, 123478-H6CDF, 123678-H6CDF, 123789-H6CDF, 234678-H6CDF, 1234678-H7CDF, 1234789-H7CDF, OCDF),
- DIN-PCBs (IUPAC No 28, 52, 101, 138, 153, 180),
- mono-ortho-PCBs (IUPAC No 105, 118, 156),
- coplanare PCBs (IUPAC No 126, 169)
- Dieldrin,
- DDT-Verbindungen bzw. -Metaboliten (op-DDD, pp-DDD, op-DDT, pp-DDT, op-DDE, pp-DDE),
- Hexachlorbenzol (HCB),
- β -Hexacyclohexan (β -HCH).

Die Bestimmung dieser Verbindungen in Humanblut wird mittlerweile von einer Reihe von Laboratorien weltweit nach der Isotopenverdünnungsmethode durchgeführt. Die besondere Schwierigkeit im Rahmen der analytischen Tätigkeiten in diesem Projekt lag in der geringen verfügbaren Probenmenge. Eine entsprechende Analyse wird normalerweise mit Blut/Serummengen von 20 – 40 g durchgeführt. Die hier vorliegenden Plasmamengen von nur 3 bis 5 g verlangten eine völlige Neuentwicklung der bisher angewendeten und validierten Methode. Erste Ergebnisse dieser Entwicklung sind auf der Dioxintagung 1997 berichtet worden (PÖPKE 1997). Die endgültig etablierte Methode lässt sich wie folgt kurz beschreiben:

Um Verluste bei der Analytik zu vermeiden, wurde aus einer einzigen Aufarbeitung die Bestimmung aller Komponenten durchgeführt. 3 bis 5 g (Mütter: 10 ml) mit den internen Standards versehenes Plasma wurden zusammen mit 3 ml (5ml) Wasser, 1 ml (2 ml) Ethanol und 3 g (4 g) Natriumchlorid auf 10 g (15 g) hochgereinigtes Chemelut (modifiziertes Kieselgel) gegeben und intensiv geschüttelt. Die Elution der die Dioxine und weitere unpolare Kontaminanten enthaltenden Fette erfolgte durch Mehrfachextraktion mittels einer Mischung aus Hexan und Isopropanol (3:2). Nach Filtration über Natriumsulfat und Lösemittelaustausch

gegen Hexan wurden auf einer Kohlesäule planare (d.h. PCDD/Fs und dioxinähnliche Moleküle) von nicht-planaren Molekülen getrennt.

Weiterbearbeitung mono- und di-ortho PCBs sowie anderer CKWs: Elution des Fettes und der Analyte von der Kohlesäule mittels Hexan (Aufgabe Fraktion). Aus dem eingeeengten Extrakt wurde die gravimetrische Fettbestimmung durchgeführt. Anschließend erfolgte die Wiederaufnahme des Extraktes in Hexan und ein Reinigungsschritt über eine Kieselgelsäule. Das Endvolumen betrug 100 µl. Die Messung erfolgte mittels HRGC/HRMS auf einer unpolaren Quarzsäule Ultra 1, L = 50 m.

Weiterbearbeitung PCDD/Fs und non-ortho (coplanare)-PCBs: Elution der Analyte von der Kohlesäule mittels Toluol (Reverse Fraktion). Der eingeeengte Toluolextrakt wurde über ein kombiniertes Säulensystem (neutrale, basische, alkalische Adsorbentien) gegeben und auf ein Endvolumen von 6 µl gebracht. Die Messung erfolgte mittels HRGC/HRMS auf einer unpolaren Quarzkapillare HP 5, L = 15 m.

Die Analytik wurde begleitet von einem umfangreichen Qualitätssicherungs-Programm. Für jeden analytischen "Gang" standen 6 separate Plätze zur Verfügung. Die 6 Plätze wurden wechselweise mit 4 bzw. 5 Proben belegt. Dabei wurde mit jedem Gang ein sog. Reagenzien-Blindwert ("Blank"), mit jedem zweiten Gang ein sog. Qualitätspool (d.h. eine Serumprobe bekannten Dioxin-Gehalts) mit analysiert. Der Verlauf dieser qualitätssichernden Maßnahmen wurde laufend dokumentiert. Ansonsten wurden alle üblichen etablierten qualitätssichernden Maßnahmen der Dioxin-Analytik durchgeführt.

Chromatographische Peaks, deren Höhe nicht das dreifache des Hintergrundrauschens (gleich Nachweisgrenze, NWG) erreichten, wurden als < NWG angegeben und für die Berechnung von Toxizitätsäquivalenten mit der halben NWG berücksichtigt. War für eine Verbindung gar kein Peak zu identifizieren, wurde die Konzentration als "nicht nachweisbar" angegeben.

Die bisher bei Vollblut benutzte gravimetrische Messung des extrahierten Fettes wurde wegen der geringen Mengen durch die genauere Gesamtfettmenge ersetzt, die sich aus den Cholesterin- und Triglycerid-Werten im Plasma berechnen läßt (PHILLIPS et al., 1989).

5.3.7 Statistische Verfahren

Die Datenverarbeitung erfolgte mit den Programmen Excel (Version 97) und SPSS (Version 8.0). Für Gruppenvergleiche wurde der Mann-Whitney-Test herangezogen. Zur univariaten Analyse grundlegender Merkmale wurde die Spearman Rangkorrelations-Analyse bzw. der Chi-Quadrat-Test angewandt. Die multivariate Analyse wurde mit linearer Regression (FAHRMEIR et al., 1996) durchgeführt. Zur Linearisierung der Untersuchungsvariablen wurde die Transformationsmethode von Box und Cox herangezogen. Grundsätzlich wurde bei p-Werten unterhalb 0,05 das Ergebnis als signifikant angesehen.

6. Ergebnisse: Laborbestimmungen

6.1 Der ^{13}C -Koffein-Atemtest

Der geplante Test wurde nur bei den ersten Kindern durchgeführt. Dabei zeigte es sich, daß hierbei keine zuverlässigen Daten zu erwarten sind: Eine der Grundvoraussetzungen des Tests, die stabile $^{13}\text{CO}_2$ -Basisexhalation während der Durchführung, ist in diesem Alter offensichtlich nicht zu gewährleisten. Dies zeigte die Messung über einen Tag bei 2 Studienkindern (delta-Werte, Abb. 6a): Die relativ große Variation der Werte im Laufe eines Tages ist vermutlich dadurch bedingt, daß Kinder in diesem Alter schon mehr oder weniger alles essen (also auch Lebensmittel mit sehr unterschiedlichem ^{13}C -Gehalt), und zwar mit relativ hohem Umsatz pro kg Körpergewicht (im Gegensatz zu Neugeborenen, die durch ihre einseitige und regelmäßige Ernährung vermutlich eine deutlich stabilere $^{13}\text{CO}_2$ -Basisexhalation haben). Hinzu kommt, daß die meisten Kinder im Alter von 11 Monaten in der Nacht durchschlafen, d.h. eine relativ lange Nahrungskarenz haben, bei der der Stoffwechsel u.U. auf die Verbrennung von Fetten umstellt mit anderer $^{13}\text{CO}_2$ -Produktion im Vergleich zur Glykogenolyse (kontinuierlicher Abfall der Basisexhalation in der Nacht bei Kind B).

Gegenüber den im Verlauf von z.T. nur wenigen Stunden auftretenden Schwankungen war der Anstieg der delta-delta-Werte bei den Atemtesten (Abb. 6b: ein Test bei Kind A, drei Teste bei Kind B) dagegen relativ gering und vom Verlauf her bei Kind B wenig reproduzierbar, so daß keine zuverlässigen Daten zu erwarten sind. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund, dass

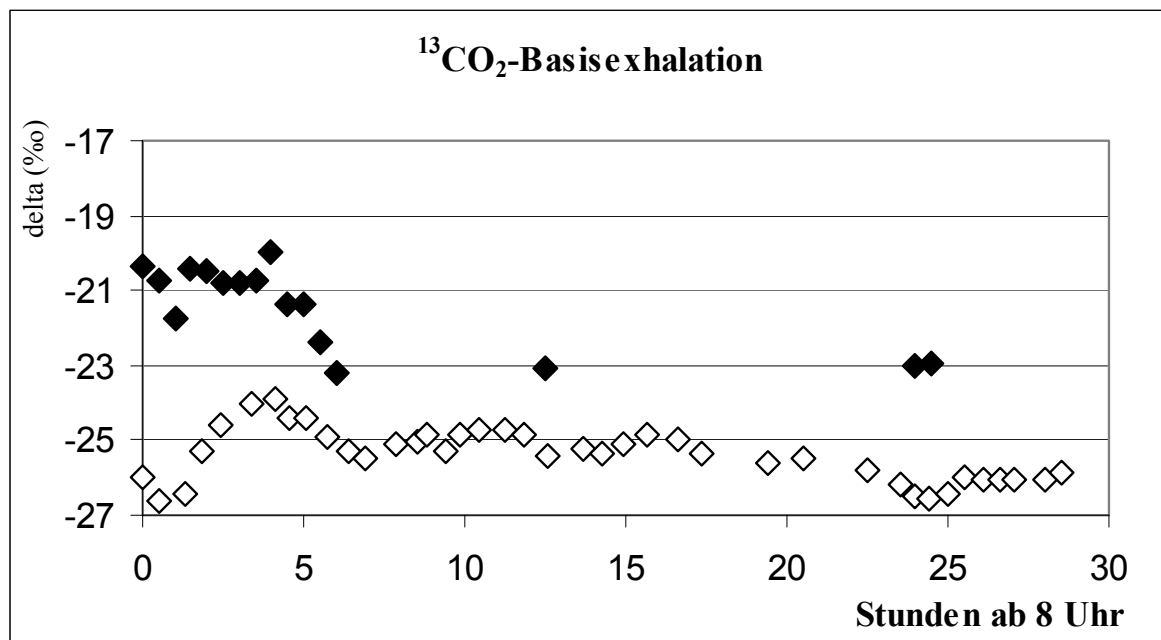


Abbildung 6.a: $^{13}\text{CO}_2$ -Basisexhalation bei zwei 11 Monate alten Kindern. Dargestellt sind jeweils die delta-Werte über einen Tag.

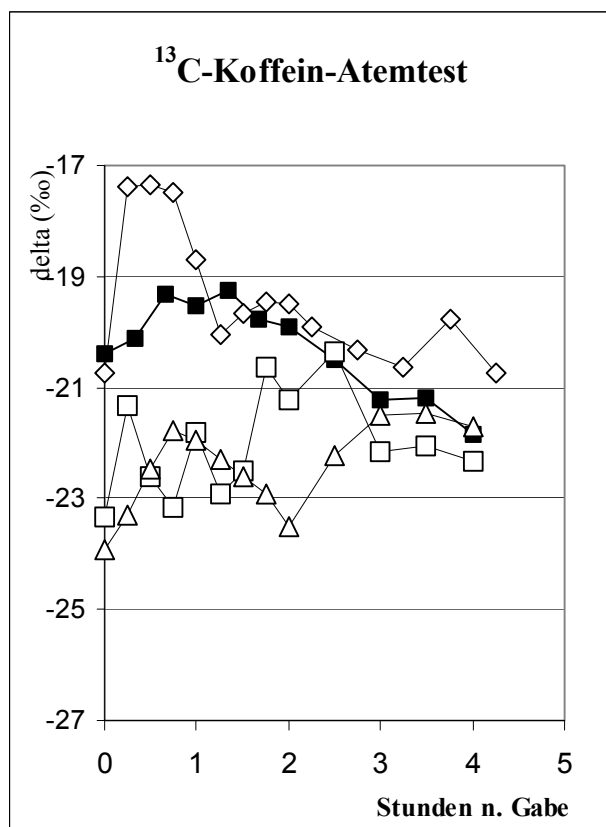


Abbildung 6.b:

¹³C-Koffein-Atemtest über 4 Stunden bei zwei 11 Monate alten Kindern Dargestellt sind jeweils die delta-Werte
Kind A: dunkle Symbole
Kind B: helle Symbole, 3 Atemteste an verschiedenen Tagen innerhalb von 2 Monaten.

die CYP1A2-Aktivität bei den Studienkindern altersbedingt noch gering ist, und nur bei starker Induktion ein sich deutlich von den Schwankungen der Basisexhalation abhebender ¹³CO₂-Anstieg zu erwarten ist. Da der Test zudem zeitaufwendig und invasiver als die Blutentnahme ist (viele Kinder wehren sich wenigstens zeitweise gegen das kurze Aufsetzen der Atemmaske), wurde hierauf nach der Untersuchung der ersten 4 Kinder verzichtet. Unter diesen Kindern war allerdings dasjenige mit der höchsten Dioxin-Konzentration (107 ppt I-TEq). Der Atemtest zeigte im Vergleich zu den anderen vier (gestillten) Kindern mit Konzentrationen zwischen 19,6 und 39,1 ppt I-TEq keine auffälligen Werte.

6.2 Erwähnenswerte Laborergebnisse (biologische Parameter)

Wie erwartet lagen die gemessenen Werte biologischer Parameter bei den gesunden Studienkindern ganz überwiegend innerhalb des Normalbereichs (soweit ein solcher durch Untersuchungen anderer ermittelt wurde). Zu beachten ist jedoch, daß bei vielen Parametern mit publiziertem Normalbereich nur eine geringe Zahl von Kindern in einem bestimmten Altersabschnitt untersucht wurde bzw. gebildete Altersklassen häufig einen relativ großen Bereich umfassen. Dies ist jedoch für die Auswertung kein Problem, da die Kinder untereinander entsprechend ihrer unterschiedlichen POP-Exposition verglichen werden sollen.

Auf den folgenden Seiten sollen für einzelne Parameter gemessene auffällige Werte kurz dargestellt werden. In keinem Fall bestand ein Zusammenhang mit der POP-Exposition.

6.2.1 Leukozytose bei Streß

Wie in Kapitel 5.1. dargestellt, waren bei der Blutentnahme 58 Kinder ganz ruhig, 30 Kinder waren zeitweise unruhig, und bei 13 Kindern konnte ein längeres Schreien nicht vermieden werden. Obwohl die Blutentnahme nur wenige Minuten dauerte, zeigten sich bei den schreienden Kindern im Durchschnitt höhere Leukozyten-Werte (Abb. 6c), die als Streßleukozytose zu interpretieren ist (Freisetzung aus kurzfristig mobilisierbaren Pools). Betroffen waren alle Haupt-Zellfraktionen. Alle gemessenen Leukozyten-Werte lagen im “Normbereich” veröffentlichter Werte, im Durchschnitt lagen die Werte jedoch relativ niedrig. Dies ist vermutlich auf die Tatsache zurückzuführen, daß üblicherweise für die Blutentnahme im Alter von einem Jahr kein “Emla”-Pflaster verwendet wird und die meisten Kinder daher bei der Blutentnahme schreien.

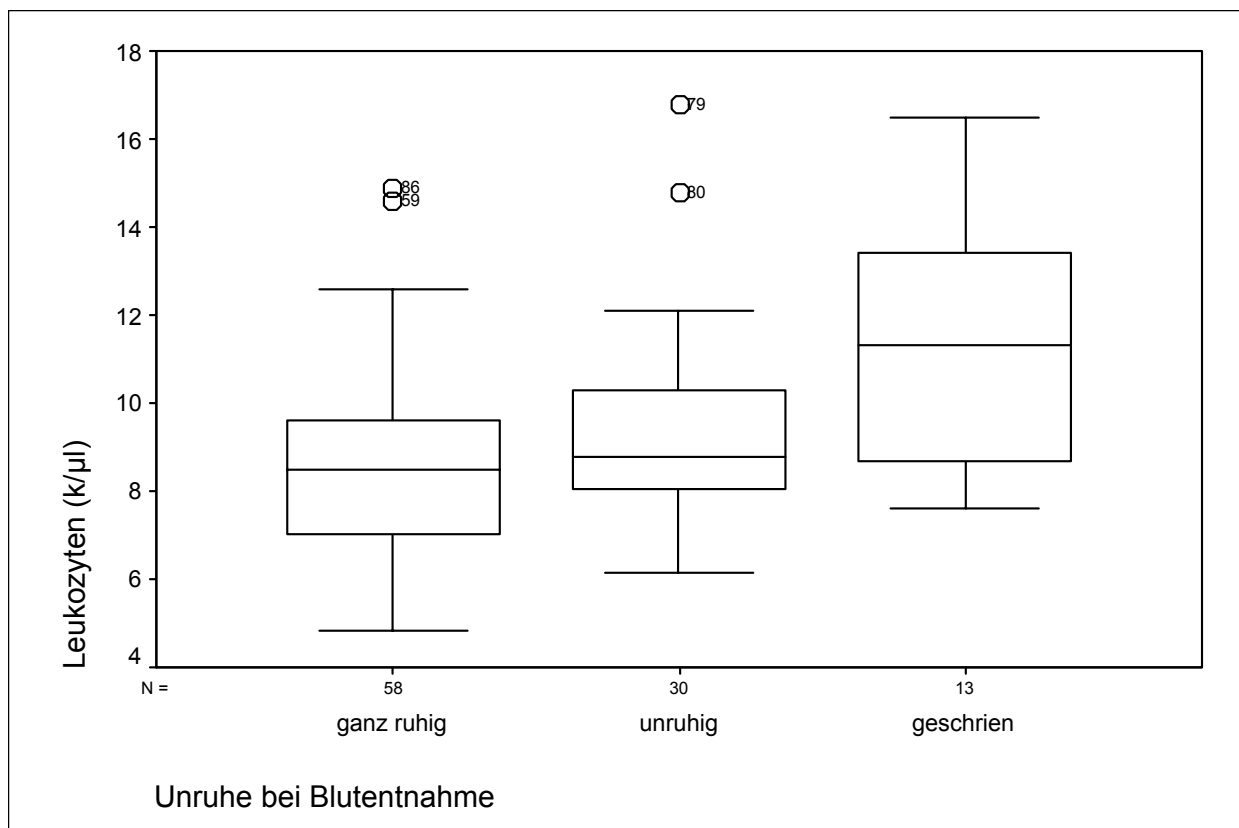


Abbildung 6.c: Boxplot-Darstellung der Leukozyten-Zahlen in Abhängigkeit von der Unruhe während der Blutentnahme. Die Differenz zwischen der Gruppe der schreienden Kinder und den anderen beiden Gruppen ist signifikant (Mann-Whitney, $p < 0,05$).

6.2.2 Alkalische Phosphatase

Bei 14 Kindern wurde die alkalischen Phosphatase (AP) mit Werten zwischen 781 und 4690 U/l über dem in der Literatur für dieses Alter angegebenen oberen Normwert von 700 U/l gemessen. Bei einem weiteren Kind wurde bei der aus einem anderen Grund durchgeführten Wiederholungs-Untersuchung ein Wert von 5640 U/l bei zuvor unauffälligem Wert gemessen. Die bei 10 Kindern daraufhin durchgeführte zweite Untersuchung ergab AP-Werte im Normbereich oder leicht oberhalb davon (712 und 886 U/l). Bei Probanden mit erhöhter AP wurde eine AP-Isoenzym-Differenzierung mittels Agarose-Gel-Elektrophorese (Firma

Sebia) durchgeführt. Es zeigt sich eine untypische Fraktion, die nicht eindeutig der Leber- oder Knochenfraktion zuzuordnen war. Ähnliche Ergebnisse mit diesem Trennverfahren wurden bereits von anderen publiziert (ONICA et al. 1992).

Das Phänomen der vorübergehenden Hyperphosphatasämie im Säuglings- und Kleinkindalter bei Leber- und Knochen-gesunden Patienten ist bislang ungeklärt, hat jedoch offensichtlich keine pathologische Bedeutung. Eine Normalisierung der Werte tritt üblicherweise innerhalb von Wochen ein. Spekulierte wurde insbesondere über eine mögliche virale Genese. Ungewöhnlich war die in dieser Studie beobachtete Häufigkeit von fast 14 %, die von anderen Untersucher nur mit maximal 3,5 % angegeben wurde (STEIN et al. 1997). Möglicherweise steht dies in Zusammenhang mit der ausschließlichen Untersuchung gesunder Kinder einer eng begrenzten Altersgruppe. Auch das Vorliegen zahlreicher weiterer Laborparameter bei dieser Studie ermöglichte nicht die Klärung der Ursache.

6.2.3 C-reaktives Protein (CrP)

Die mit Routine-Methoden bestimmten CrP-Werte zur Identifizierung von Kindern mit Entzündungsprozessen (insbesondere bei Beteiligung von Granulozyten) lagen bei allen unter dem üblicherweise angegebenen Grenzwert von 0,6 mg/dl. Lediglich bei einem Kind lag der Wert bei 1,5 mg/dl; bei der daraufhin durchgeführten Wiederholungs-Untersuchung innerhalb des Altersfensters lag der Wert unterhalb 0,6 mg/dl. Daher wurden bei diesem Kind die bei der zweiten Untersuchung ermittelten Parameter bei der Auswertung berücksichtigt.

Aus dem eingefrorenen Plasma wurde nach Abschluß der Untersuchungsphase von allen Kindern der CrP-Wert erneut bestimmt unter Verwendung einer sensibleren Methode. Durch die Anwendung solcher Methoden sind in den vergangenen Jahren bei Erwachsenen neue Erkenntnisse über eine mögliche Beteiligung von Entzündungsprozessen z.B. bei der Entstehung der Arteriosklerose gewonnen worden. Bei der erneuten Bestimmung lagen die Werte von 33 Kindern unterhalb der Nachweisgrenze von 0,02 mg/dl. Der Median-Wert betrug 0,026 mg/dl, 22 Kinder lagen über dem dreifachen Wert von 0,075 mg/dl (maximal 0,8 mg/dl). Erstaunlicherweise zeigte sich auch auf diesem niedrigen Niveau eine z.T. hochsignifikante Assoziation der CrP-Werte mit Parametern der Akutphase-Reaktion (niedrigeres Prealbumin, Retinol, Eisen und freies Thyroxin, höheres Thyroxin-bindendes Protein). Ursache für höhere CrP-Werte ist vermutlich die Aktivierung von Granulozyten (u.a. IL-6-vermittelte Triggerung der Akutphase-Reaktion; Übersicht in GABAY AND KUSHNER, 1999), bedingt durch bei kleinen Kindern schnell entstehende bakterielle Superinfektionen bei viralen Luftwegsinfekten. Dies ist durch die klinische Untersuchung nicht zu erkennen: 33% der Kinder mit und 14 % derjenigen ohne leichte Infektzeichen hatten CrP-Werte über 0,075 mg/dl. Zumindest bei Kindern im Alter von einem Jahr ist die minimale Infektion ein wichtiger Studien-Confounder. Sie kann mit empfindlichen Methoden als CrP gemessen und so bei der statistischen Auswertung von an der Akutphase-Reaktion beteiligten Parametern berücksichtigt werden.

6.2.4 Eiweiß und Eisen-Versorgung gestillter Kinder

Als ein mögliches Problem langen Stillens kann eine schlechtere Nährstoff-Versorgung auftreten. Tatsächlich fanden sich in Abhängigkeit von der Stilldauer niedrigere Albumin- und Hämoglobin-Werte, allerdings nur bei den Berliner Kindern (fehlender Effekt bei den Ilseburger Kindern vermutlich durch höheren Fleischverzehr bei deren Müttern). Ein Vergleich kindlicher und mütterlicher Hämoglobin-Werte zeigte bei nicht gestillten Kindern keine Korrelation mit den mütterlichen Werten (Spearman Korrelationskoeffizient $-0,085$, $p=0,713$; $n=21$). Offensichtlich spielen genetische Faktoren sowie die teilweise gleiche Ernährung von Mutter und Kind keine wesentliche Rolle für die Verteilung von deren Hämoglobin-Werten. Bei bis 32 Wochen äquivalent voll gestillten Kindern zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der kindlichen von den mütterlichen Werten (Spearman Korrelationskoeffizient $0,380$; $p=0,016$; $n=40$), die bei den länger als 32 Wochen äquivalent voll gestillten Kindern noch stärker wurde (Spearman Korrelationskoeffizient $0,585$; $p<0,001$; $n=40$). Somit waren die kindlichen Hämoglobin-Werte mit steigender Stilldauer zunehmend mit dem Hämoglobin-Wert der Mutter korreliert, was ursächlich auf die mütterliche Eisen-Versorgung zurückzuführen sein dürfte (je länger gestillt, desto höhere kindliche Abhängigkeit vom mütterlichen Eisen-Status).

Der kindliche Eisen-Status selbst ist nachwievor durch keinen Parameter gut zu erfassen. Eisen im Plasma spiegelt grundsätzlich nicht unbedingt die Gesamt-Eisenbeladung des Körpers wider und ist stark von der Aktivierung der Akutphase-Reaktion abhängig (Bindung des Eisens im retikulo-endotheliale System). So hatten 18 (44%) der 41 Kinder mit Eisen-Werten unter $10 \mu\text{mol/l}$ CrP-Werte oberhalb $0,075 \text{ mg/dl}$, während dies für nur 4 (7%) der 60 Kinder mit Eisen-Werten über $10 \mu\text{mol/l}$ zutraf. Trotz dieser Einschränkung korrelierte das Plasma-Eisen gut mit dem Hämoglobin-Wert des Kindes (Spearman Korrelationskoeffizient $0,362$, $p<0,001$, $n=101$), während das angeblich besser das gespeicherte Eisen repräsentierende Ferritin und das Transferrin nicht mit den Hämoglobin-Werten korrelierte (Spearman Korrelationskoeffizient $-0,003$ bzw. $0,016$). Zumindest für das Alter von 11 Monaten erwies sich somit das Ferritin als wertlos für die Beantwortung der Frage eines möglichen Eisenmangels. Die Werte des löslichen Transferrin-Rezeptor (sTfR, in vielen Labor in letzter Zeit als Marker für einen Eisenmangel eingeführt) korrelierte zwar signifikant mit dem Hämoglobin (Spearman Korrelationskoeffizient $0,257$; $p=0,010$; $n=101$), jedoch weniger gut als Plasma-Eisen. Zudem zeigte sich auch dieser Parameter (entgegen Veröffentlichungen bei Erwachsenen mit chronischen Entzündungen) als nicht unabhängig von der Akutphase-Reaktion: Kinder mit CrP-Werten unterhalb ($n=79$) oder oberhalb ($n=21$) von $0,075 \text{ mg/dl}$ unterschieden sich signifikant im Gruppenvergleich (Mann-Whitney-Test, $p<0,05$).

6.2.5 Immunreaktionen auf Impfungen

Zur Prüfung eines möglichen POP-Einflusses auf das Immunsystem erschien die Reaktion der Kinder auf die Impfungen als eine wichtige Untersuchung, geht es hierbei doch um das komplexe Zusammenspiel von verschiedenen Teilfunktionen, die sich als Lymphozyten-Proliferation und spezifischer Antikörper-Spiegel im Plasma messen lassen.

Bei der Lymphozyten-Proliferation (maximale cpm von 3 Konzentrationen zur Stimulation) zeigte sich beim Tetanus kein signifikanter Unterschied beim Gruppen-Vergleich zwischen den 84 dreimal DT-geimpften Kindern und den 17 nur zweimal geimpften (Mann-Whitney-Test; $p=0,139$), während bei Diphtherie ein signifikanter Unterschied bestand ($p=0,031$). Beide Parameter korrelierten nicht mit der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit (Spearman Korrelationskoeffizient: Tetanus $-0,044$; $p=0,664$, Diphtherie $-0,045$; $p=0,660$), untereinander bestand eine hohe Korrelation (Spearman Korrelationskoeffizient $0,779$; $p<0,001$).

Im Gegensatz zur Lymphozyten-Proliferation zeigte sich bei den im Plasma gemessenen Spiegeln der spezifischen Impfantikörper von Tetanus (IgG und -IgG₁, untereinander sehr stark korreliert: $r=0,992$) und Hämophilus infl. Typ B (HiB) eine starke Abhängigkeit von der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit mit Spearman Korrelationskoeffizienten von $0,543$ (Tetanus-IgG), $0,540$ (Tetanus-IgG₁) und $0,489$ (anti-HiB). Exemplarisch ist in Abbildung 6d der Zusammenhang für Tetanus-IgG graphisch dargestellt.

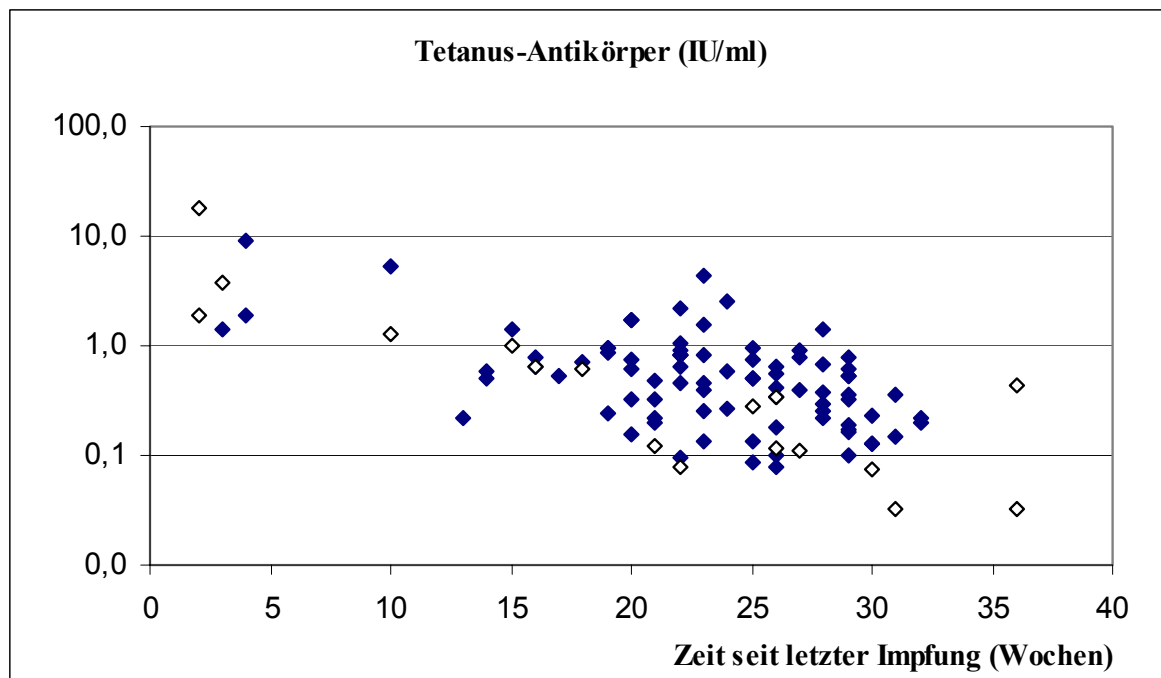


Abbildung 6.d: Streudiagramm: Tetanus-Antikörper (spezifisches Gesamt-IgG) und seit der letzten Impfung vergangene Zeit, dargestellt für 3x (dunkle Symbole) und 2x (helle Symbole) geimpfte Kinder.

Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, zeigten nur 2x geimpfte Kinder bei gleicher seit der letzten Impfung vergangener Zeit durchschnittlich niedrigere Antikörper-Titer. Bei multivariater Analyse mittels linearer Regression von \log (Antikörper-Titer) ergab sich für Tetanus-IgG ein höchstsignifikanter Einfluß der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit ($\beta=-0,643$, $p<0,001$). Der Einfluß der Zahl der Impfungen war deutlich geringer, aber immer noch hochsignifikant ($\beta=0,209$, $p=0,009$). Die Varianzaufklärung des Modells betrug 43,2 %. Die entsprechenden Zahlen für die HiB-Impfung waren: Zeit seit letzter Impfung $\beta=0,564$ ($p<0,001$), Anzahl der Impfungen $\beta=0,059$ ($p=0,498$, somit keine Signifikanz), Varianzaufklärung 34,5 %.

Die unterschiedliche Abhängigkeit der zellulären und der humoralen Funktion von der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit spiegelt die raschere Entwicklung des T-Zell-System im Vergleich zu der noch deutlich unreiferen B-Zell-Funktion wider.

6.2.6 Gesamt-Cholesterin

Pathologisch hohe Cholesterin-Werte von über 200 mg/dl (208-309 mg/dl) fanden sich bei 6 Kindern (5,9%). Die hohen Werte wurden bei 2 Kindern durch eine zweite Untersuchung bestätigt. Durch die breite Palette von durchgeführten Laboruntersuchungen konnte eine sekundäre Hypercholesterinämie weitgehend ausgeschlossen werden. Genetisch bedingte Störungen des Fett-Metabolismus gehören zu den häufigsten Stoffwechselstörungen. Von den 6 Kindern fand sich bei einer Mutter ein eindeutig pathologischer Cholesterin-Wert (324 mg/dl), bei einer weiteren Mutter war die Fettstoffwechselstörung bereits länger bekannt (Behandlung mit einem Lipidsenker), bei einem der Väter bestanden anamnestisch hohe Cholesterin-Werte. Bei den verbleibenden 3 Kindern hatten die Mütter ebenfalls relativ hohe Werte (208, 223, 224 mg/dl, der Median-Wert aller Mütter betrug 182 mg/dl).

6.2.7 Ah-Rezeptor-Polymorphismus

Im Rahmen einer anderen vom Forschungszentrum Karlsruhe geförderten Studie (PUG U 96001), die sich mit dem Ah-Rezeptor-Polymorphismus als möglichem Einflußfaktor für die klinische Ausprägung von Chlorakne beschäftigte, wurde von Dr. Wanner (Institut für Molekularbiologie und Biochemie der FU Berlin) von den ersten 32 Kindern und deren Müttern dieser Polymorphismus untersucht. Die gefundene Allel-Frequenz im Kodon 554 bei Kaukasiern unterschied sich von publizierten Frequenz von Japanern, jedoch wurde kein Zusammenhang mit der Chlorakne-Intensität festgestellt (WANNER et al., 1999).

6.2.8 Schwermetalle

Die Schwermetalle wurden im Blut von Mutter und Kind (Blei, Kadmium, Quecksilber) sowie im Urin des Kindes (Kadmium, Quecksilber, Arsen) untersucht. Alle gemessenen Werte waren unauffällig in Bezug auf die Orientierungswerte in human-biologischen Untersuchungsmaterialien (BgVV, Kategorie I), bis auf einen erhöhten Blei-Wert bei einem Berliner Kind von 197 µg/l (Obergrenze Kategorie I: 150 µg/l). Da es sich um eines der ersten untersuchten Kinder handelte und die Schwermetall-Analysen erst nach Abschluß der Untersuchungsphase durchgeführt wurden, konnte eine Kontroll-Untersuchung erst 2 Jahre später durchgeführt werden. Sie ergab einen Blei-Wert von 127 µg/l. Während die beiden älteren Geschwister sowie die Eltern keine auffälligen Werte zeigten, wurde bei dem inzwischen geborenen Bruder (1 Jahr und 8 Monate alt) eine Blei-Konzentration von 227 µg/l festgestellt. Bei ihm ließen sich als Effekt der Blei-Belastung eine mikrozytäre, hypochrome Anämie (MCV 58,8 fl, MCH 18,3 pg, Hb 10,1 g/dl) messen mit pathognomonischer Erhöhung des Zink-Protoporphyrins IX auf das vierfache der Norm. Durch umfangreiche Untersuchungen im Haushalt wurden als wahrscheinlichste Quelle Keramik-Gefäße ausgemacht, in denen die Familie die Milch aufbewahrte.

Gestillte Kinder hatten im Vergleich zu den nicht gestillten Kindern signifikant höhere Blei-Werte im Blut. Dieser Unterschied fand sich auch bei den Müttern. Die Werte von Kind und Mutter waren hochsignifikant untereinander korreliert, vermutlich aufgrund gleicher Belastungsquellen. Die Stilldauer hatte keinen wesentlichen Einfluß auf die kindlichen Werte. Bei allen gemessenen Schwermetall-Konzentrationen unterschieden sich die Ilsenburger Kinder und Mütter nicht von denen der Berliner. Bei den Müttern ließ sich die bekannte starke Abhängigkeit der Kadmium-Blutwerte von der Zahl der gerauchten Zigaretten bestätigen sowie die Abhängigkeit der Quecksilber-Blutwerte von der Zahl der mit Amalgam gefüllten Zähne.

6.2.9 Nitrat/Nitrit im Trinkwasser

In allen Haushalten wurden Trinkwasserproben genommen und mit einfachen Streifentests auf Nitrat und Nitrit untersucht. Lediglich eine Probe aus einem Dorf nördlich von Ilseburg (eigene Wasserversorgung) zeigte eine über dem Grenzwert (50 mg/l) liegende Nitrat-Belastung von 100 mg/l. Das Problem war durch frühere Analysen bereits bekannt, das Kind erhielt daher für die Nahrungszubereitung käufliches Mineralwasser.

6.2.10 Kotinin im Urin

Zur geplanten Quantifizierung der Zigarettenrauch-Exposition bei nicht gestillten Kinder durch ein möglicherweise objektiveres Verfahren (im Vergleich zu anamnestischen Angaben) war die Messung des Nikotin-Abbauproduktes Kotinin im Urin geplant. Bei den ersten Bestimmungen von ausgewählten Proben (Bezug auf Kreatinin) zeigten sich in beiden Richtungen starke Diskrepanzen zwischen den gemessenen Werten und den anamnestischen Angaben, die z.T. direkt überprüfbar war (verrauchte Wohnung). Eine Ursache für die offensichtliche Ungenauigkeit des Meßverfahrens dürfte teilweise darin begründet sein, daß im Alter von einem Jahr nur ein verschieden stark konzentrierter Spontanurin zu gewinnen war. Bei großen Fallzahlen sind offensichtlich statistische Aussagen z.B. über den Zusammenhang von passiver Zigarettenrauch-Exposition und Urin-Kotinin möglich; für die Feststellung der individuellen Belastung machte die Messung aber offensichtlich wenig Sinn.

6.3 Biologische Variation von Laborparametern

Wie oben erwähnt, wurde bei 36 Kindern eine 2. Blutentnahme durchgeführt, so daß für die untersuchten biologischen Parameter die intraindividuelle Variation innerhalb weniger Wochen ermittelt werden konnte (Tabelle 6a). Die Frage war, wie stark die Werte für einzelne Parameter innerhalb eines relativ kurzen Zeitraums von durchschnittlich 4 Wochen schwanken in Relation zur Gesamtstreuung der Werte: nur bei Parametern mit hoher Reproduzierbarkeit macht die Frage nach einer möglichen Beeinflussung durch POPs einen Sinn, da die POP-Konzentrationen innerhalb eines kurzen Zeitraums nicht wesentlich variieren. Es kommt dabei nicht auf die absolute Reproduzierbarkeit an. So ist z.B. Natrium mit Werten von ca. 140 mmol/l ein intraindividuell sicher gut reproduzierbarer Wert, jedoch wird bei alle Kindern der Wert um 140 mmol/l liegen. Auf der anderen Seite kann der Wert für einen spezifischen Antikörper durchaus um 50% bei zwei Untersuchungen variieren, um bei der hohen Gesamtvarianz von bis zu 3 Zehnerpotenzen noch als gut reproduzierbar zu gelten. Berechnet wurde daher y_{Reprod} als Quotient aus dem Mittelwert der absoluten Differenzwerte (zwischen erster und zweiter Bestimmung) und der Standardabweichung der Werte in der Gesamtgruppe:

$$y_{\text{Reprod}} = (\sum |x_1 - x_2| / n) / s$$

x_1, x_2	Wert des biolog. Parameters x bei der ersten bzw. zweiten Bestimmung bei einzelnen von insgesamt n Kindern
n	Zahl der Kinder mit Wiederholungsbestimmungen
s	Standardabweichung des biolog. Parameters für die Gesamtgruppe (101 Kinder)

Wie erwartet waren insbesondere die Immunglobuline (Hauptgruppen und spezifische Antikörper), aber auch einige Lymphozyten-Subpopulationen (z.B. CD4/CD8-Ratio) und die Lymphozyten-Proliferation auf Antigene (Candida, Tetanus, Diphtherie) gut reproduzierbar mit y_{Reprod} -Werten unter 0,5 (durchschnittliche Differenz kleiner als das 0,5-fachen der Standardabweichung). Auf der anderen Seite der Skala lagen etliche Parameter, die in der Akutphase-Reaktion beeinflußt werden (siehe 6.2.3). Für diese macht es wenig Sinn, sie auf die mögliche Beeinflußbarkeit durch POPs hin zu überprüfen, da beobachtete Assoziationen wahrscheinlich zufällig entstanden sind.

Tabelle 6.a: Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der Werte einzelner Labor-Parameter innerhalb weniger Wochen. Berechnet und als y_{Reprod} bezeichnet wurde der Quotient aus dem Mittelwert der absoluten Differenzwerte (zwischen erster und zweiter Bestimmung) und der Standardabweichung der Werte in der Gesamtgruppe. Die Parameter wurde entsprechend ihrer y_{Reprod} -Werte geordnet. Die Zahl der Wiederholungs-Untersuchungen variiert pro Parameter, da nicht immer für alle Untersuchungen bei der 2. Blutentnahme genug Material zur Verfügung stand. Bei kursiv gesetzten Parametern wurden die y_{Reprod} -Werte wegen des großen Variationsbereiches (z.T. 3 Zehnerpotenzen) aus den zuvor logarithmierten Werten berechnet, da anderenfalls der y_{Reprod} -Wert ausschließlich von Kindern mit hohen Werten des jeweiligen biologischen Parameters bestimmt wird.

Parameter (klin. Chemie, Blutbild, Immunglobuline)	n=	y_{Reprod}	Parameter (Lymphozyten-Subpopulationen, Proliferation, Zytokin-Produktion)	n=	y_{Reprod}
<i>anti-HiB (mg/l)</i>	34	0,185	CD27 ⁻ (%CD8 ^{hi} -Lymph.)	35	0,218
<i>anti-Tet. IgG (IU/ml)</i>	34	0,227	CD8 ^{hi} CD11a ^{lo} (% Lymph.)	35	0,233
IgG ₂ (mg/dl)	25	0,229	CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ (%CD4 ⁺ -L.)	35	0,255
<i>anti-Tet. IgG₁ (mg/l)</i>	34	0,261	CD45RO ⁺ CD45RA ⁺ (%CD4 ⁺ -L.)	35	0,260
IgG (mg/dl)	34	0,289			
MCV (fl)	33	0,316	CD4/CD8 ⁻ Ratio (T-Lymph.)	35	0,325
AP (U/l) ohne Extremw..	20	0,336	<i>IL-5 PHA-PBMCs 2d (pg/ml)</i>	26	0,330
IgG ₁ (mg/dl)	34	0,334	<i>Proliferat. Candida 0,5 U/ml (cpm)</i>	30	0,349
IgG ₄ (mg/dl)	33	0,355	CD45RO ⁺ CD45RA ⁺ (%CD8 ⁺ -L.)	35	0,361
MCH (pg)	33	0,374	CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ (%CD4 ⁺ -L.)	35	0,365
			CD8 ^{hi} CD11a ^{hi} (% Lymph.)	35	0,370
			CD3 ⁺ CD8 ⁺ (%Lymph.)	35	0,374
			CD11a ^{hi} (% CD8 ^{hi} -Lymph.)	35	0,391
			<i>Proliferat. Tet. 40 Lf/ml (cpm)</i>	33	0,399
IgA (mg/dl)	34	0,442	CD29 ^{hi} CD49d ^{hi} (%CD4 ⁺ -Lymph.)	36	0,412
IgG ₃ (mg/dl)	34	0,424	CD45RO ⁻ CD45RA ⁺ (%CD8 ⁺ -L.)	35	0,413
Cholesterin (mg/dl)	31	0,497	HLA-DR ⁺ (%CD8 ^{hi} -Lymph.)	35	0,422
IgM (mg/dl)	34	0,499	CD23 ⁺ (%CD19 ⁺ CD21 ⁻ -Lymph.)	35	0,424
			CD26 ⁺ (%CD4 ⁺ -Lymph.)	35	0,432
			<i>Proliferat. Diph. 40 Lf/ml (cpm)</i>	33	0,442
			CD28 ^{hi} (%CD4 ⁺ -Lymph.)	35	0,457
			CD26 ⁺ (%CD8 ^{hi} -Lymph.)	35	0,464
			CD3 ⁺ (%Lymph.)	35	0,471
			CD62L ⁺ (%CD8 ^{hi} -Lymph.)	35	0,494
			CD56 ⁺ CD57 ⁺ (%CD8 ^{hi} -Lymph.)	36	0,494

Tabelle 6a (Fortsetzung)

Parameter (klin. Chemie, Blutbild, Immunglobuline)	n=	Y _{Reprod}	Parameter (Lymphozyten-Subpopulationen, Proliferation, Zytokin-Produktion)	n=	Y _{Reprod}
Hämoglobin (g/dl)	33	0,508	CD4 ⁺ (%Lymph.)	35	0,500
Transferrin (mg/dl)	27	0,513	CD29 ^{hi} CD28 ^{hi} (%CD4 ⁺ -Lymph.)	35	0,512
TSH (μU/ml)	32	0,550	HLA-DR ⁺ (%CD4 ⁺ -Lymph.)	35	0,515
Gesamt-T ₄ (μg/dl)	31	0,553	CD8 ⁺ CD11a ^{hi} (% Lymph.)	35	0,546
Lymphozyten (K/μl)	36	0,561	CD25 ⁺ (%CD4 ⁺ -Lymph.)	35	0,549
Kreatinin (mg/dl)	19	0,564	TCRγδ ⁺ αβ ⁻ (%CD2 ⁺ -Lymph.)	35	0,566
Albumin (g/dl)	27	0,574	CD19 ⁺ (%Lymph.)	35	0,567
freies T ₄ (ng/dl)	26	0,586	<i>Proliferat. IL-2 50 U/ml (cpm)</i>	30	0,578
			<i>Proliferat. PHA 3 μg/ml (cpm)</i>	30	0,597
Thyr-bind. Glob. (μg/ml)	27	0,611	CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ (%CD8 ⁺ -L.)	35	0,600
γ-GT (U/l)	31	0,613	CD19 ⁺ CD21 ⁺ (%Lymph.)	35	0,605
Glukose (mg/dl)	20	0,651	<i>Proliferat. PWM 1,5 μg/ml (cpm)</i>	30	0,642
Leukozyten (K/μl)	36	0,652	CD23 ⁺ (%CD19 ⁺ CD21 ⁺ -Lymph.)	35	0,645
Hämatokrit (l/l)	33	0,674	CD19 ⁺ CD21 ⁻ (%Lymph.)	35	0,667
Ferritin (μg/l)	34	0,680	TCRγδ ⁻ αβ ⁺ (%CD2 ⁺ -Lymph.)	35	0,688
Gesamtbilirubin (mg/dl)	30	0,685	CD62L ⁺ (%CD4 ⁺ -Lymph.)	35	0,699
sTfR (mg/l)	34	0,690	<i>IFN PHA-PBMCs 2d (pg/ml)</i>	27	0,699
Thrombozyten (K/μl)	32	0,723	CD29 ^{hi} (%CD4 ⁺ -Lymph.)	35	0,704
Triglyceride (mg/dl)	31	0,724	<i>Proliferat. ConA 6 μg/ml (cpm)</i>	30	0,735
LDH (U/l)	27	0,735	CD3 ⁻ CD56/CD16 ⁺ (%Lymph.)	35	0,744
Gesamteiweiß (g/dl)	31	0,742	<i>Proliferat. SEB 12 ng/ml (cpm)</i>	30	0,781
Monozyten (K/μl)	36	0,742			
Erythrozyten (M/μl)	33	0,755	CD21 ⁺ (%CD19 ⁺ -Lymph.)	36	0,840
Gesamt-T ₃ (ng/ml)	32	0,783	CD25 ⁺ (%CD8 ⁺ -Lymph.)	35	0,873
ALT (U/l)	32	0,809	<i>Proliferat. anti-CD3 10 ng/ml (cpm)</i>	30	0,883
Eosinophile (K/μl)	36	0,827	<i>IL-10 PHA-PBMCs 2d (pg/ml)</i>	27	0,891
Basophile (K/μl)	36	0,853			
α-Tocopherol (mg/l)	28	0,860	NK-Lyse (%)	15	0,969
Prealbumin (mg/dl)	34	0,877			
sCrP (mg/dl)	27	0,902			
Neutrophile (K/μl)	36	0,942			
Retinol (mg/l)	28	0,981			
Eisen (μmol/l)	31	0,985			
Retikulozyten (%)	33	1,001			
AP (U/l)	32	1,066			
AST (U/l)	33	1,176			
freies Hb (mg/dl)	32	1,386			

7. Ergebnisse: POP-Analysen

Insgesamt wurden entsprechend der Beschreibung (5.3.6.) 175 POP-Analysen aus Plasma bei der ERGO Forschungsgesellschaft durchgeführt:

- von allen gestillten 80 Kindern und deren Müttern.
- von 5 nicht gestillten Kindern und deren Müttern. Von den verbleibenden 16 nicht gestillten Kindern und deren Müttern wurden jeweils 2 gepoolte Analysen durchgeführt, aufgeteilt nach dem Geburtsort der Mutter (DDR oder alte BRD).
- von einem Kind mit einem überraschend niedrigen I-TEq-Wert aus Ilsenburg (1,7 ppt) wurde kurzfristig eine zweite Blutentnahme durchgeführt. Die Analyse bestätigte den Wert (2,0 ppt, z.T. mit besseren Nachweisgrenzen).

Die in den folgenden Kapiteln dargestellten POP-Werte dieser Studie sind alle auf Gesamtfett im Plasma bezogen, das nach Formel aus Cholesterin und Triglyceriden berechnet wurde.

Von den in 5.3.6. aufgeführten 37 Verbindungen waren erwartungsgemäß 15 auch bei den gestillten Kindern unter der Nachweisgrenze oder ganz überwiegend unter der Nachweisgrenze:

- von den 2378-substituierten Dibenzofuranen die Verbindungen 2378-T4CDF, 12378-P5CDF, 123789-H6CDF, 1234789-H7CDF und OCDF. Dies ist üblicherweise auch bei Muttermilch-Analysen im Hintergrundbereich der Fall, so daß insgesamt 12 Dioxin/Furan-Verbindungen bestimmt werden konnten ("dirty dozen").
- von den sogenannten DIN-PCBs die Verbindungen Nr. 28, 52, 101 (Nachweisgrenze durchschnittlich 6 ppb).
- von den mono-ortho-PCBs die Verbindung Nr. 105 (Nachweisgrenze durchschnittlich 6 ppb, bei 8 gestillten Kindern Werte knapp darüber bestimmbar, maximaler Wert 18 ppb).
- von den Pestiziden die Verbindungen Dieldrin sowie op-DDD, pp-DDD, op-DDT und op-DDE (Nachweisgrenze durchschnittlich 20 ppb). Die Verbindung pp-DDT war bei gleicher Nachweisgrenze bei 18 (22,5%) der gestillten Kinder meßbar mit Werten zwischen 24 und 173 ppb (Median 46 ppb). Von den zugehörigen Müttern waren 14 in der DDR geboren. Im Gegensatz dazu waren die Werte des DDT-Hauptmetaboliten pp-DDE bei allen gestillten Kindern meßbar. Bei den 18 Kindern mit meßbaren pp-DDT-Werten lagen die pp-DDE Werte entsprechend den Erwartungen deutlich höher (im Median 21-fach).

Mit ganz wenigen Ausnahmen waren somit 22 Verbindungen bei allen gestillten Kindern meßbar: 12 PCDD/Fs, 7 PCBs (126, 169, 118, 156, 138, 153, 180) sowie β -HCH, HCB und pp-DDE.

Für PCDD/Fs wurden Toxizitäts-Äquivalente berechnet. Als Toxizitäts-Äquivalenz-Faktoren (TEFs) wurden bis vor kurzem üblicherweise die 1988 von einer NATO-Arbeitsgruppe etablierten Werte benutzt (I-TEFs, nur für PCDD/Fs), die auch für die bisher dargestellten

Muttermilch-Analysen verwendet wurden (3.3.). Kürzlich wurden von einer WHO-Arbeitsgruppe neue Faktoren publiziert (WHO-TEFs, VAN DEN BERG et al., 1998), die sich nur für wenige Verbindungen von den I-TEFs unterschieden. Relevant ist dabei lediglich die Änderung bei 12378-P5CDD (von 0,5 auf 1,0, d.h. Gleichstellung mit 2378-TCDD), die zu ca. 15% höheren Werten führt. Diese Änderung ist insgesamt eher als ärgerlich einzustufen, da in Zukunft sicher Probleme beim Vergleich mit älteren Analysen auftreten werden. Es ist jedoch anzunehmen, daß sich die WHO-Werte durchsetzen, auch weil sie TEFs für co-planare und mono-ortho-PCBs enthalten, die von vielen Arbeitsgruppen bei der Berechnung von Toxizitäts-Äquivalenten ebenfalls berücksichtigt werden. Dies ist jedoch als problematisch einzustufen und wurde von unserer Arbeitsgruppe bisher vermieden, da für eine so weitgehende Einbeziehung keine wissenschaftliche Basis besteht (es sind den Ah-Rezeptor betreffend auch partielle Antagonisten einbezogen, die je nach Zusammensetzung des Gemisches Wirkungen von Agonisten blockieren könnten; dadurch würde mit einem Gesamt-WHO-TEQ die dem 2378-TCDD entsprechende Konzentration zu hoch angegeben). Für die Auswertung dieser Studie wurden zusätzlich zu den I-TEQ-Werten dennoch WHO-TEQ-Werte für co-planare und mono-ortho-PCBs berechnet und für Korrelations-Analysen mit biologischen Parametern benutzt (als Gesamt-TEQ), um der Kritik entgegenzutreten, daß ohne ein solches Vorgehen u.U. Effekte übersehen werden.

7.1 Gestillte Kinder

In Tabelle 7a sind für die 80 gestillten Kinder die POP-Konzentrationen der erwähnten 22 Verbindungen sowie die berechneten Toxizitäts-Äquivalente angegeben (Minimum, 25. Perzentile, Median, 75. Perzentile, Maximum). Die Minimum-Werte stammten überwiegend von dem bereits erwähnten Kind mit überraschend niedrigem I-TEQ-Wert (2,0 ppt). Die nächst höheren I-TEQ-Werte stammten mit 8,1 ppt und 9,4 ppt ebenfalls aus der Region Ilsenburg (alle Mütter hatten sogar lebenslang in Ilsenburg gewohnt), gehörten aber zu denjenigen mit der kürzesten Stilldauer (siehe auch Abbildung 7b). Die zugehörigen mütterlichen I-TEQ-Blutwerte betrugen 9,1 ppt, 26,1 ppt und 16,3 ppt.

Wie erwartet kamen die Kinder mit den höchsten PCDD/F-Werten aus der Region Ilsenburg. Insgesamt hatten 6 Kinder I-TEQ-Werte über 50 ppt (107,0; 69,2; 59,2; 58,1; 56,6; 54,6), nur eins dieser Kind kam aus Berlin (58,1 ppt; dieses Kind fiel mit relativ geringer Gewichtszunahme in den letzten Wochen auf und hatte bei der Untersuchung mit 7,30 kg das geringste Körpergewicht; u.U. hat in diesem Fall eine relativ geringe Fettmasse die relativ hohe Konzentration mitbedingt; die mütterliche Konzentration betrug 11,7 ppt). Von den 20 Kindern oberhalb der 75. Perzentile (31,1 ppt) kamen 13 aus Berlin, 6 aus Ilsenburg und 1 Kind aus Maulach/Crailsheim.

Wie weiter unten dargestellt, hat die Stilldauer einen wesentlichen Einfluß auf die Höhe der kindlichen POP-Werte. Da in Ilsenburg die äquivalente Vollstilldauer durchschnittlich 1,2 Monate kürzer war als bei den Berliner Kindern, und bei etlichen Müttern aus Ilsenburg gar keine überdurchschnittlich hohen I-TEQ-Werte gefunden wurden, unterschied sich der Median-Wert der 53 nicht aus Ilsenburg kommenden Kinder (25,3 ppt) nicht wesentlich von dem der Ilsenburger Kinder (26,2 ppt). Die Verteilung der kindlichen und mütterlichen I-TEQ-Werte ist graphisch in Abbildung 7a dargestellt.

Tabelle 7.a: Gemessene POP-Konzentrationen (pg bzw. ng pro g Blutfett) der 80 gestillten Kinder (Minimum, 25. Perzentile, Median, 75. Perzentile, Maximum).

Verbindung		Min.	25. P.	Median	75. P.	Max.
pg/g						
2378-TCDD		n.n. (1,1)	2,6	3,5	4,6	12,3
12378-P5CDD		n.n. (1,4)	5,9	8,0	10,7	25,6
123478-H6CDD		n.n. (1,4)	5,6	7,3	10,1	35,2
123678-H6CDD		n.n. (1,3)	17,3	24,4	36,9	67,9
123789-H6CDD		n.n. (0,9)	4,0	5,8	7,5	16,1
1234678-H7CDD		8,6	27,6	35,3	49,9	145,5
OCDD		80,9	197,4	249,9	346,3	961,8
23478-P5CDF		2,3	14,7	19,8	26,1	85,9
123478-H6CDF		2,6	7,7	10,6	15,7	138,2
123678-H6CDF		1,7	6,1	9,6	12,9	90,3
234678-H6CDF		0,8	2,3	3,0	4,1	42,9
1234678-H7CDF		4,3	8,5	11,0	14,4	108,1
PCB126		36,5	86,9	137,3	192,6	424,0
PCB169		9,7	73,1	101,9	144,2	313,7
ng/g						
PCB118		n.n. (6)	21,6	37,1	50,2	160,8
PCB156		n.n. (6)	7,7	14,7	21,2	50,2
PCB138		17,2	90,5	141,9	210,2	558,2
PCB153		15,9	95,7	155,8	233,7	606,6
PCB180		7,3	52,7	94,6	154,5	330,9
Summe PCB 138,153,180		44,0	237,1	395,1	575,8	1489,0
pp-DDE		50,4	300,9	523,9	954,8	2536,3
β-HCH		n.n. (20)	36,1	54,0	81,5	197,4
Hexachlorbenzol		n.n. (20)	99,3	141,2	220,8	826,1
pg/g						
I-TEQ		2,0	19,5	25,3	31,1	107,0
WHO-TEQ PCDD/Fs		2,0	22,2	29,3	36,0	119,5
WHO-TEQ copl. PCBs		3,7	9,8	14,8	20,5	44,4
WHO-TEQ mono-ortho PCBs		0,9	6,4	11,8	15,4	40,3
Gesamt-WHO-TEQ		5,8	43,0	52,5	74,3	173,9

n.n. = nicht nachweisbar (Nachweisgrenze)

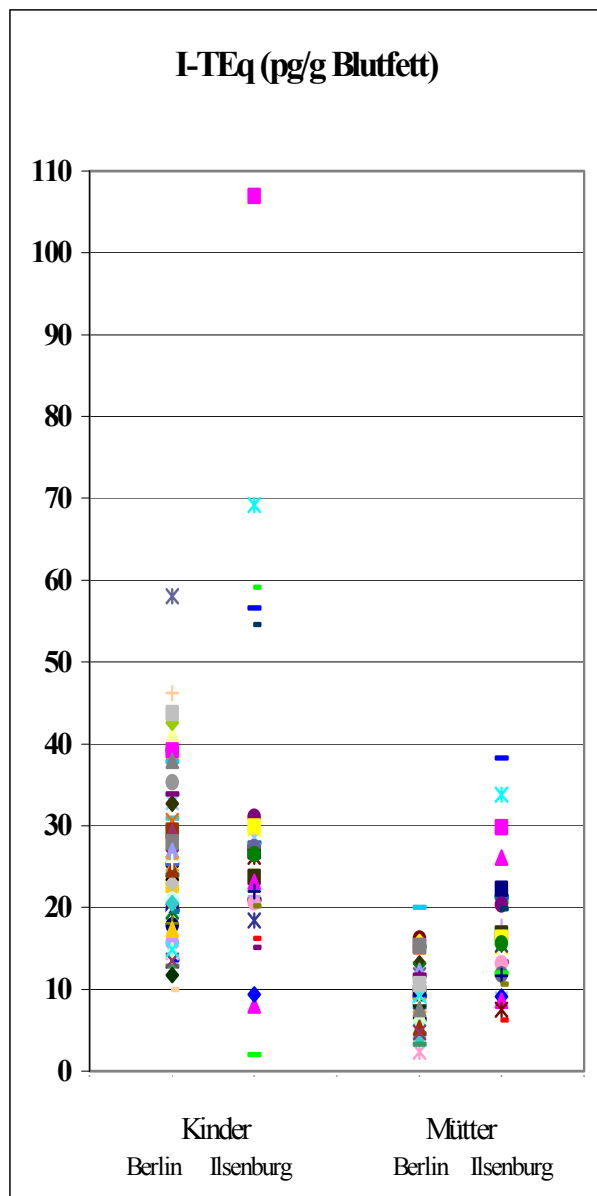


Abbildung 7.a:
I-TEq-Werte von 80 gestillten Kindern und deren Müttern in Berlin und in der Region Ilseburg

Bei Betrachtung der Median-Werte für einzelne Verbindungen lagen die 27 Ilseburger Kinder im Vergleich mit den anderen Kindern deutlich höher bei den Verbindungen 23478-P5CDF, den 3 meßbaren Hexafuranen sowie beim PCB169 (entsprechend dem Pattern der von der Kupferhütte emittierten Verbindungen). Keinen wesentlichen Unterschied gab es beim HCB.

Auffällige Unterschiede in den beiden betrachteten Gruppen gab es auch beim pp-DDE (deutlich höhere Werte in Ilseburg), während sämtliche PCB-Werte bis auf die von PCB169 deutlich niedriger lagen. Diese Differenzen sind nicht durch die Kupferhütte bedingt, sondern sie spiegeln die unterschiedliche Industriegeschichte in Ost und West wider: aus wenigen POP-Verbindungen der gestillten Kinder ließ sich mit hoher Wahrscheinlichkeit sagen, ob die Mutter in der DDR oder der alten BRD geboren und aufgewachsen war.

Dies wird besonders deutlich bei einer Gruppen-Aufteilung nach der alten Staatszugehörigkeit der Mütter (n=33 DDR, n=47 alte BRD): das Verhältnis der Median-Werte (Ost/West) der kindlichen POP-Werte lag mit Abstand am höchsten für pp-DDE (2,24), bedingt durch den noch bis Mitte der 80er Jahre gestatteten Gebrauch von DDT (in der alten BRD wurde DDT 1972 weitgehend verboten). Die Relationen für β -HCH und HCB lagen um 1 (1,02 bzw. 0,98), während für die meisten PCBs diese Verhältnis-Werte deutlich niedriger lagen: PCB 138 (0,54), PCB 153 (0,51), PCB 180 (0,42), PCB 118 (0,48), PCB 156 (0,46), PCB 126 (0,58). Lediglich bei PCB169 (1,17) und I-TEq (1,00) gab es keinen wesentlichen Unterschied der Median-Werte,

weil sich die üblicherweise bei Müttern aus der DDR niedriger liegenden Werte durch den hohen Anteil von Ilsenburger Müttern ausgleichen

Grundsätzlich ist anzunehmen, daß die Höhe der kindlichen POP-Werte von den wesentlichen Einflußgrößen Stilldauer (äquivalente Vollstilldauer) und Höhe der mütterlichen POP-Werte bestimmt wird. Bei Überprüfung in einem linearen Modell für alle 80 gestillten Kinder zeigen sich beide Faktoren ungefähr als gleich stark (β -Werte für standardisierte Koeffizienten 0,723 bzw. 0,738), mit einer Varianzaufklärung (R^2) von 56,5%. Wird der Body mass index des Kindes (als grobes Maß für Körperfettmasse) hinzugenommen, so hat diese Größe keinen signifikanten Einfluß ($\beta = -0,107$; $p = 0,16$), der Wert für R^2 erhöht sich leicht auf 57,6%.

Bei den 80 gestillten Kindern gab es trotz des unterschiedlichen Musters in der POP-Zusammensetzung in der Muttermilch (DDR - alte BRD, Ilsenburg - Berlin) eine hohe Korrelation der einzelnen Verbindungen bzw. Verbindungs-Gruppen untereinander (Tabelle 7b).

Tabelle 7.b: Korrelation der verschiedenen POP-Verbindungen untereinander bei den gestillten Kindern ($n=80$). Angegeben sind die Korrelations-Koeffizienten (Spearman zweiseitig).

	I-TEq	Σ PCB 138, 153,180	PCB126	PCB156	β -HCH	HCB
Σ PCB 138,153,180	0,568					
PCB126	0,572	0,645				
PCB156	0,528	0,950	0,577			
β -HCH	0,611	0,568	0,482	0,534		
HCB	0,736	0,480	0,456	0,475	0,797	
pp-DDE	0,607	0,293	0,294	0,218*	0,557	0,634

* einziges nicht signifikantes Paar ($p=0,052$)

7.2 Nicht gestillte Kinder

Wie bereits erwähnt, wurden aus verschiedenen Gründen (Kosten, schlechtere Nachweisgrenzen bei Einzelanalysen, keine größere Variation der Werte erwartet) bei den nicht gestillten Kindern nur je 5 Einzelanalysen von Kindern und zugehörigen Müttern gemacht. Von den verbleibenden 16 nicht gestillten Kindern und deren Müttern wurden gepoolte Analysen durchgeführt. Da die ersten POP-Analysen deutliche Unterschiede im Verteilungsmuster in Abhängigkeit vom Geburtsstaat der Mutter gezeigt hatten, wurde eine entsprechende Aufteilung vorgenommen: jeweils ein Pool von Kind und Mutter mit n=4 (Mutter in DDR geboren) und einer mit n=12 (Mutter nicht in DDR geboren). Die für jede Person eingesetzte Plasmamenge wurde so berechnet, daß jeweils die gleiche Fettmenge in den Pool einging (berechnet aus Cholesterin- und Triglycerid-Werten nach Formel).

Die Ergebnisse sind in Tabelle 7c zusammengestellt. Erwartungsgemäß zeigte sich der Ost-West-Unterschied auch in diesen Proben der Mütter, und er war ebenfalls bei den Kindern noch deutlich zu erkennen. Bei den Kindern kann jedoch nicht zwischen pränataler (mütterlicher) und postnataler (Ernährung) Herkunft unterschieden werden. Entsprechend den theoretischen Erwartungen und den eigenen Voruntersuchungen (ABRAHAM et al., 1996) bestätigte sich, daß nicht gestillte Kinder im Alter von 11 Monaten aufgrund der im Vergleich zu Humanmilch niedrigen Konzentrationen in Kuhmilch und aufgrund des schnellen Wachstums im ersten Lebensjahr deutlich niedrigere POP-Werte haben als ihre Mütter.

Die Ergebnisse der fünf einzeln analysierten Mutter/Kind-Paare entsprachen grob den in Tabelle 7c dargestellten Werten und sollen hier nicht im einzelnen wiedergegeben werden. Eine der fünf Mütter war in der DDR geboren. Aufgrund der niedrigen Konzentrationen bei den Kindern lagen diese bei vielen Verbindungen in der Nähe oder unterhalb der Nachweisgrenze. Die I-TEQ-Werte variierten zwischen 1,9 und 3,2 ppt (Mütter zwischen 9,3 und 13,1 ppt), die PCB126-Werte zwischen 23 und 31 (Mütter zwischen 43 bis 98 ppt), die pp-DDE-Werte zwischen 26 und 99 ppb (Mütter zwischen 60 bis 941 ppb) und die Werte für die Summe der PCBs 138,153,180 zwischen 16 und 87 ppb (Mütter zwischen 132 bis 305 ppb).

Tabelle 7.c: POP-Konzentrationen im Blutfett von gepoolten Proben von nicht gestillten Kindern und deren Müttern, die entweder in der DDR (n=4, Ost) oder der alten BRD (n=12, West) geboren und aufgewachsen waren. Angegeben ist ferner jeweils das Verhältnis von kindlichen und mütterlichen Werten (K/M).

Verbindung	Kind Ost	Mutter Ost	K/M Ost	Kind West	Mutter West	K/M West
pg/g						
2378-TCDD	n.n. (0,7)	1,3		0,6	1,4	0,46
12378-P5CDD	1,3	3,4	0,39	1,0	4,2	0,24
123478-H6CDD	n.n. (0,7)	1,7		n.n. (0,6)	2,5	
123678-H6CDD	1,0	5,9	0,18	1,8	16,6	0,11
123789-H6CDD	n.n. (0,7)	1,7		0,6	3,3	0,20
1234678-H7CDD	4,5	11,6	0,39	8,3	21,2	0,39
OCDD	69,8	146,6	0,48	77,4	235,0	0,33
23478-P5CDF	1,4	5,0	0,27	1,1	6,0	0,19
123478-H6CDF	1,5	3,8	0,38	1,5	4,2	0,36
123678-H6CDF	0,7	2,4	0,31	0,8	2,7	0,28
234678-H6CDF	0,4	0,9	0,42	0,3	0,8	0,39
1234678-H7CDF	4,9	7,3	0,67	4,7	6,0	0,79
PCB126	12,0	30,7	0,39	12,7	37,7	0,34
PCB169	3,8	29,0	0,13	4,7	49,0	0,10
ng/g						
PCB118	2,0	6,4	0,31	2,0	10,1	0,20
PCB156	n.n. (2,0)	3,2		n.n. (2,0)	6,7	
PCB138	3,9	33,8	0,12	8,0	68,8	0,12
PCB153	3,9	43,4	0,09	9,9	92,3	0,11
PCB180	2,0	25,7	0,08	6,0	58,8	0,10
Summe PCB 138,153,180	9,8	102,9	0,10	23,9	219,9	0,11
pp-DDE	53,0	366,4	0,14	23,9	188,0	0,13
β-HCH	n.n. (9,8)	20,9		n.n. (9,9)	20,1	
Hexachlorbenzol	9,8	48,2	0,20	11,9	55,4	0,22
pg/g						
I-TEQ	1,9	7,6	0,26	2,5	10,1	0,25
WHO-TEQ PCDD/Fs	1,9	9,2	0,21	2,5	11,98	0,21
WHO-TEQ copl. PCBs	1,2	3,4	0,37	1,3	4,3	0,31
WHO-TEQ mono-ortho PCBs	0,2	2,4	0,08	0,2	4,7	0,04
Gesamt-WHO-TEQ	3,4	14,9	0,23	4,0	20,9	0,19

n.n. = nicht nachweisbar (Nachweisgrenze)

7.3 Vergleich gestillte – nicht gestillte Kinder

Entsprechend den Erwartungen lagen die POP-Werte der gestillten Kinder deutlich höher als die der nicht gestillten Kinder (bis auf die bereits erwähnte Ausnahme). Das Verhältnis der Konzentrationen von gestillten und nicht gestillten Kindern ist natürlich von der Stilldauer und weiteren Faktoren wie “Region Ilsenburg” abhängig. In Abbildung 7b sind die gemessenen I-TEq-Konzentrationen der Kinder in Abhängigkeit von der Stilldauer aufgetragen (helle Symbole: Region Ilsenburg). Die 21 nicht gestillten Kinder aus Berlin hatten im Durchschnitt (Pool-Analysen entsprechend der Anzahl gewichtet) eine I-TEq-Konzentration von 2,4 ppt und waren damit mehr als zehn mal niedriger als die gestillten Kinder aus Berlin (Median 25,3 ppt) und aus der Region Ilsenburg (Median 26,2 ppt), bei einer äquivalenten Vollstilldauer im Median von 34 bzw. 28 Wochen. In gleicher Größenordnung liegen die Relationen für die anderen POPs.

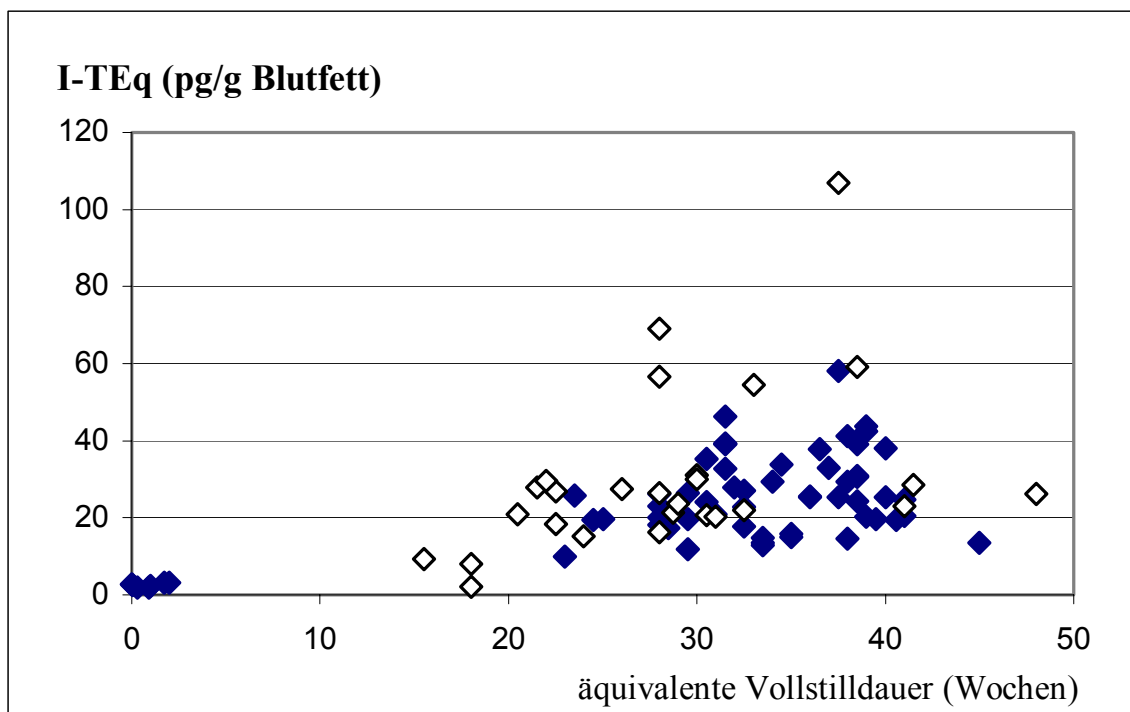


Abbildung 7.b: Kindliche I-TEq-Konzentrationen in Abhängigkeit von der äquivalenten Vollstilldauer. Helle Symbole: Region Ilsenburg (n=27).

7.4 Mütterliche POP-Werte

Aus Platzgründen werden an dieser Stelle nur die I-TEq-Werte dargestellt. Die Mütter der 21 nicht gestillten Kinder aus Berlin hatten im Mittel eine I-TEq-Konzentration von 9,8 ppt (Pool-Analysen entsprechend der Anzahl gewichtet), die gestillten insgesamt eine von 12,1 ppt (Median 10,7 ppt). Die Median-Werte betrugen bei den Ilsenburger Müttern 15,6 ppt, bei den Berliner Müttern 9,3 ppt. Die 9 Mütter mit I-TEq-Werten über 20 ppt kamen alle aus Ilsenburg und Umgebung. Die höchste Konzentration bei den Berliner Müttern betrug genau 20,0 ppt, die niedrigste 2,3 ppt (diese Mutter hatte schon 2 vorher geborene Kinder lange gestillt). Der I-TEq-Wert der Mutter aus Maulach bzw. Crailsheim betrug 15,3 ppt. Auf die Problematik der absoluten Höhe der Werte wird in diesem Kapitel noch eingegangen (7.6.).

Die Verteilung der mütterlichen I-TEq-Werte ist in Abbildung 7c in Abhängigkeit vom Alter dargestellt. Gesondert hervorgehoben sind die Mütter aus Ilsenburg (helle Symbole): bei Ihnen war der Einfluß des besonderen Faktors "Kupferhütte" (verbrachte Lebensjahre in Ilsenburg und Umgebung, Eier aus Bodenhaltung) so stark, daß der übliche Einfluß des Alters nicht mehr nachweisbar war ($R^2 = 0,02\%$). Bei den anderen Müttern ($n=58$ inkl. der 5 nicht stillenden Mütter mit Einzelanalysen) zeigte sich die erwartete Altersabhängigkeit (Pearson $R^2 = 11,4\%$). Die Regressionsgrade ergab einen mittleren Anstieg von 0,34 ppt I-TEq pro Lebensjahr und entspricht damit den Ergebnissen anderer Untersuchungen: 8 Arbeiten verschiedener Untersucher ermittelten I-TEq-Werte in verschiedenen Matrices mit einer Zunahme zwischen 0,3 und 0,8 ppt pro Lebensjahr (zusammengestellt in PÄPKE 1998).

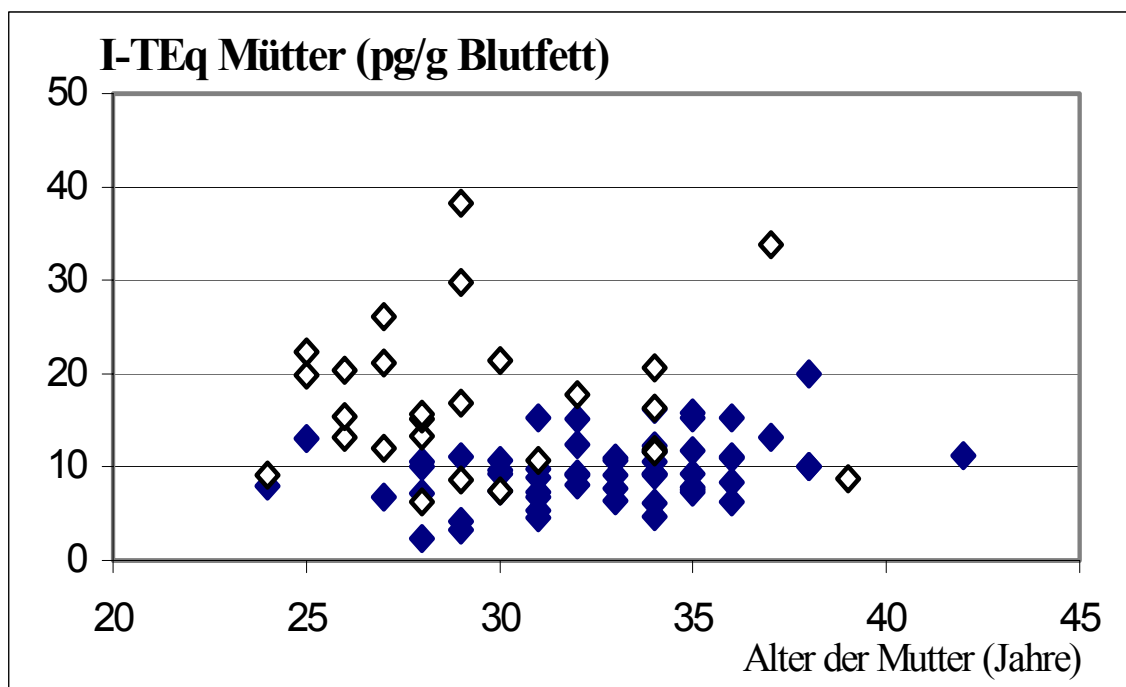


Abbildung 7.c: I-TEq-Konzentrationen aller Mütter mit Einzelanalysen ($n=85$) in Abhängigkeit vom Alter. Helle Symbole: Region Ilsenburg ($n=27$).

Da die Höhe der mütterlichen Werte wesentlich von den Faktoren Geburtsstaat und Ilsenburg mitbestimmt wurden, war eine Prüfung der bekannten sonstigen Einflußgrößen nur an einer homogenen Untergruppe sinnvoll: als größte Gruppe boten sich die der 43 stillenden Mütter aus Berlin und Umgebung an, die aus dem Westen stammten. Bei multivariater Betrachtung von 7 Einflußgrößen in einem linearen Modell unter Verwendung von log. nat. (mütterl. I-TEq-Wert) waren höchstsignifikante Einflußfaktoren die äquivalente Vollstilldauer der älteren Kinder ($\beta = -0,622$; $p < 0,001$) und das Alter der Mutter ($\beta = 0,448$; $p < 0,001$), während die äquivalente Vollstilldauer des jetzt gestillten Kindes nur noch gerade signifikant war ($\beta = 0,228$; $p < 0,05$). Nicht mehr signifikant und vom Einfluß her abnehmende Größen waren der Fischverzehr ($\beta = 0,149$; $p = 0,13$), die Gewichtsentwicklung während der aktuellen Stillperiode ($\beta = -0,054$; $p = 0,57$), der Fleischverzehr ($\beta = -0,028$; $p = 0,77$) und der Body mass index ($\beta = -0,019$; $p = 0,85$). Die Varianzaufklärung (R^2) des Modells betrug 73,4%.

7.5 Akkumulation von POPs in Abhängigkeit von der Stilldauer

Eine der interessantesten Fragen des Projekts war sicherlich die der Akkumulation der verschiedenen POPs im Kind (gegenüber der Mutter) in Abhängigkeit von der Stilldauer bzw. der gesamten von der Mutter an das Kind abgegebenen Milchfettmenge. Für letztere ist die äquivalente Vollstilldauer der beste Parameter. In Abbildung 7d ist das Verhältnis von kindlicher und mütterlicher I-TEq-Konzentration gegenüber der äquivalenten Vollstilldauer aufgetragen. Hierbei sei daran erinnert, daß alle Werte im Alter von durchschnittlich 11,6 Monaten gemessen wurden, und daß in den Quotienten sowohl der mit der Stilldauer ansteigende I-TEq-Wert beim Kind als auch der gleichzeitig abfallende Wert bei der Mutter eingeht. Es ist deshalb anzunehmen, daß ein nur relativ kurz (z.B. 4 Monate) gestilltes Kind zum Zeitpunkt des Abstillens schon eine höhere Konzentration hatte als zum Untersuchungsalter von 11,6 Monaten, da es zwischenzeitlich gewachsen war und so seine POP-Werte "verdünnt" hatte.

Wie aus der Abbildung 7d oben bzw. noch besser aus der darunter befindlichen halblogarithmischen Darstellung zu ersehen ist, beschreibt eine e-Funktion die Verteilung der Werte am besten, und es ist daher bei einer Verdopplung der Stilldauer eine Verdopplung des log. nat. des POP-Verhältnisses Kind/Mutter im Alter von 11,6 Monaten zu erwarten. In Tabelle 7d sind die entsprechenden Berechnungen für 21 POP-Verbindungen durchgeführt (bei PCB156 nicht, da in allen Analysen nicht gestillter Kinder inklusive der beiden Pools die Verbindung nicht nachweisbar war). Dabei zeigten sich teilweise erstaunlich gute Werte für das Bestimmtheitsmaß (R^2 , bei 10 Einzelverbindungen über 75%). Schlechtere R^2 -Werte sind vermutlich bei einigen Verbindungen durch die in der Nähe der Nachweisgrenzen liegenden Konzentrationen bedingt (z.B. 2378-TCDD). Bei anderen Verbindungen (insbesondere bei OCDD) ist zu vermuten, daß noch andere, bisher nicht identifizierte Quellen zu einer Vergrößerung der Streuung führen (generelles Phänomen: hoher OCDD-"Body burden" und hohe OCDD-Ausscheidung über den Stuhl sind bei Bilanzbetrachtungen nicht durch die relativ geringe orale OCDD-Zufuhr mit der Nahrung zu erklären, z.B. ABRAHAM et al., 1996).

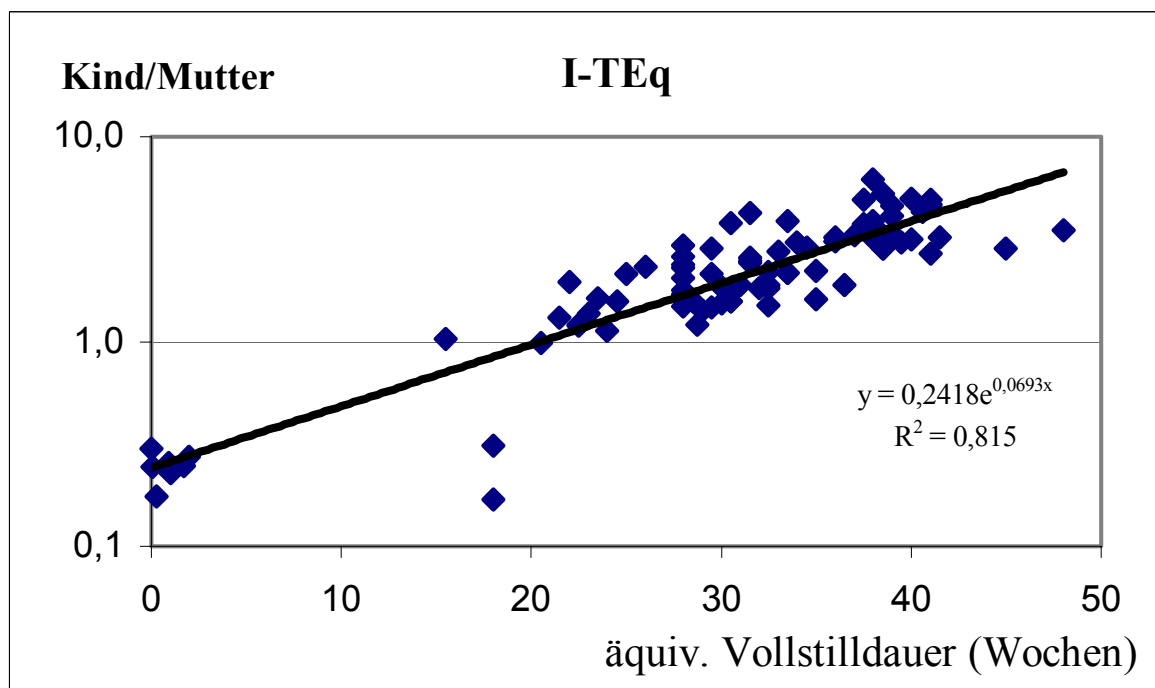
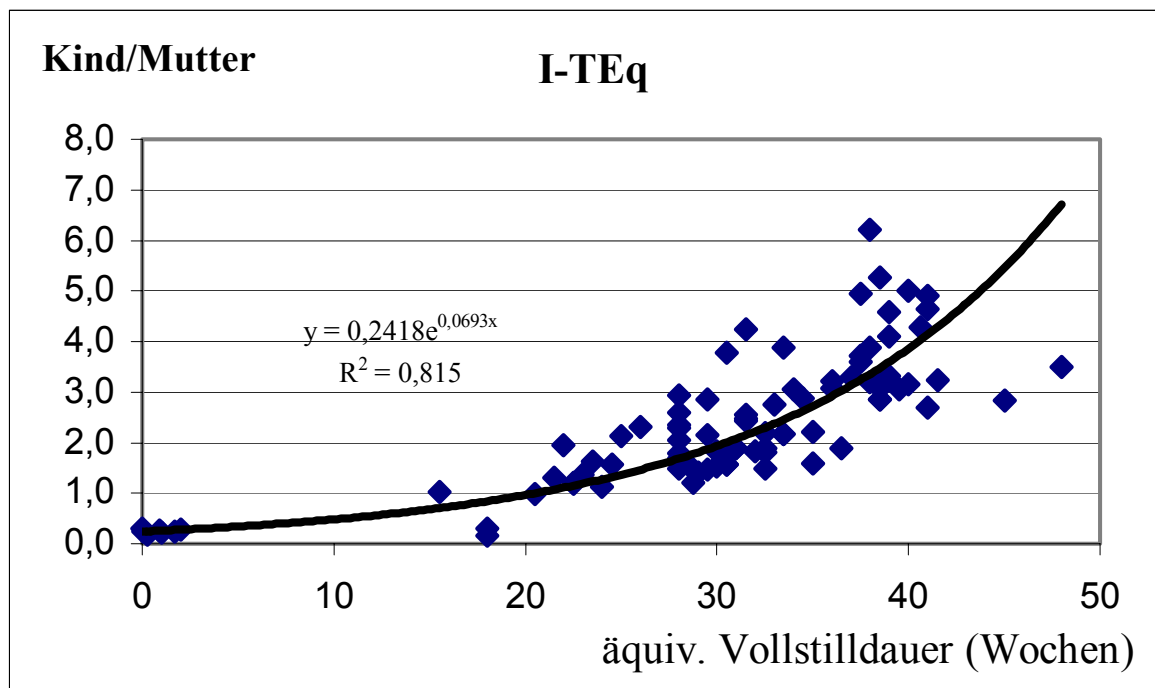


Abbildung 7.d: Verhältnis der I-TEq-Werte von Kind und Mutter zum Zeitpunkt der Untersuchung (Kind ca. 11,6 Monate alt), oben in linearer, unten in halb logarithmischer Darstellung. Eingezeichnet ist als Regressionskurve eine e-Funktion mit Bestimmtheitsmaß (Pearson R^2). Fallzahl: 80 gestillte und 7 (5+2) nicht gestillte Kinder; die beiden gepoolten Analysen nicht gestillter Kinder wurden wie einzelne Kinder behandelt.

Tabelle 7.d: Parameter der e-Funktionen ($y=y_0e^{kx}$, y: POP-Verhältnis Kind/Mutter, x: äquivalente Vollstilldauer in Wochen) sowie das R^2 als beste Regression für die verschiedenen POPs. Angegeben ist ferner das aus diesen Funktionen berechnete POP-Verhältnis bei einer Vollstilldauer von 6 Monaten und die erforderliche Vollstilldauer zum Erreichen gleich hoher Werte bei Mutter und Kind (jeweils zum Untersuchungszeitpunkt von 11,6 Monaten). In der letzten Spalte ist die Rangfolge der Akkumulation der einzelnen Verbindungen angegeben.

Verbindung	y_0	k	R^2	K/M n. 26 Wo.	1:1 nach(Wochen)	Rang
2378-TCDD*	0,56	0,042	0,460	1,67	13,7	5
12378-P5CDD***	0,38	0,058	0,649	1,70	16,8	4
123478-H6CDD*	0,29	0,059	0,495	1,31	21,4	16
123678-H6CDD	0,20	0,072	0,836	1,31	22,3	15
123789-H6CDD**	0,34	0,063	0,673	1,71	17,4	3
1234678-H7CDD	0,34	0,045	0,615	1,09	24,1	19
OCDD	0,38	0,032	0,435	0,87	30,3	21
23478-P5CDF	0,27	0,070	0,756	1,66	18,7	6
123478-H6CDF	0,41	0,053	0,719	1,62	17,0	8
123678-H6CDF	0,30	0,064	0,751	1,59	18,8	9
234678-H6CDF	0,50	0,043	0,448	1,50	16,5	13
1234678-H7CDF	0,81	0,025	0,245	1,55	8,5	11
PCB126	0,38	0,056	0,760	1,66	17,1	7
PCB169	0,16	0,076	0,822	1,13	24,4	17
PCB118**	0,34	0,067	0,633	1,94	16,1	2
PCB156	bei keiner Analyse nicht gestillter Kinder nachweisbar					
PCB138	0,19	0,080	0,819	1,50	21,0	14
PCB153	0,14	0,080	0,825	1,13	24,5	18
PCB180	0,13	0,077	0,807	0,97	26,5	20
Summe PCB 138,153,180	0,15	0,079	0,827	1,19	23,8	
pp-DDE	0,22	0,075	0,779	1,57	20,0	10
β-HCH*	0,34	0,071	0,701	2,15	15,3	1
Hexachlorbenzol***	0,21	0,075	0,823	1,51	20,5	12
I-TEQ	0,24	0,069	0,815	1,47	20,5	
WHO-TEQ PCDD/Fs	0,22	0,072	0,813	1,46	20,8	
WHO-TEQ copl. PCBs	0,36	0,058	0,780	1,60	17,9	
WHO-TEQ mono-ortho PCBs	Berechnung nicht sinnvoll: siehe PCB 156					
Gesamt-WHO-TEQ	0,22	0,073	0,847	1,43	21,0	

Einschränkungen: * nur 1 ** nur 2 *** nur 3 nicht gestillte Kindern/Pool mit meßbaren Werten, Korrelation am unteren Ende dadurch nur von wenigen Punkten bestimmt.

Für die 21 Einzelverbindungen ließ sich eine Rangfolge des Akkumulations-Verhaltens aufstellen, das sich anschaulicher widerspiegelt im erwarteten POP-Verhältnis Kind/Mutter nach sechs Monaten Vollstillzeit, oder in der für ein 1:1 POP-Verhältnis von Kind und Mutter notwendigen Vollstillzeit (Tabelle 7d, jeweils aus den ermittelten Funktionen berechnet für den Untersuchungszeitpunkt von 11,6 Monaten). Dabei zeigte sich in allen Verbindungsgruppen eine deutlich höhere Akkumulation bei den niedriger chlorierten im Vergleich zu den höher chlorierten Verbindungen. Erwartungsgemäß am deutlichsten zeigte sich dies bei OCDD, bei dem die Mechanismen aus anderen Untersuchungen am einfachsten abzuleiten sind: im Vergleich mit mütterlichem Blut sind die Werte in der Muttermilch deutlich niedriger (z.B. Pöpke 1998), und die Resorptionsraten beim Kind sind deutlich geringer als bei weniger stark chlorierten Verbindungen (z.B. ABRAHAM et al., 1996). Vermutlich liegt also ursächlich eine geringere Fähigkeit zum Passieren von Membranen vor, u.U. spielen auch, wie schon erwähnt, weitere Quellen eine Rolle (spekulativ: Aufnahme über die Haut?, Bildung im Körper?).

An einem Modells für die Akkumulation während der Stillperiode wird zur Zeit noch gearbeitet, die Ergebnisse werden nachgereicht.

7.6 Vergleich von I-TEq-Konzentrationen in Muttermilch und -blut

Wie erwähnt, wurden zur Rekrutierung höher exponierter Mütter auch Muttermilch-Analysen durchgeführt. Von 14 Müttern liegen nun I-TEq-Bestimmungen sowohl vom Blutplasma (Bestimmungen bei ERGO) als auch von Muttermilch vor (Bestimmungen im BgVV Berlin, n=12, beim Lebensmitteluntersuchungsamt Oldenburg, n=1, sowie bei der Chemischen Landesuntersuchungsanstalt Freiburg, n=1). Während die Blutentnahmen einheitlich durchschnittlich 11,6 Monate nach der Entbindung vorgenommen wurden, war der Zeitpunkt der Probennahme für die Muttermilch nicht einheitlich (überwiegend jedoch im 2. Teil der Stillperiode). Trotz dieser Variation fand sich eine bemerkenswerte Korrelation zwischen den Blut- und Milchdaten für I-TEq (Abbildung 7e, $R^2 = 89,9 \%$; selbstverständlich waren der ERGO Forschungsgesellschaft die Ergebnisse der Muttermilch-Analysen nicht bekannt).

Die Darstellung der Korrelation der I-TEq-Werte in den beiden Matrices wirft jedoch einige grundsätzliche Fragen auf, die noch der Klärung bedürfen: durchschnittlich waren die gemessenen Werte im Milchfett 2,2 mal höher als im Plasmafett. Diese Diskrepanz ist sowohl für die zentrale Frage dieses Projektes (POP-Wirkungen auf biologische Parameter?) als auch für das im letzten Kapitel dargestellte Akkumulationsverhalten in Abhängigkeit von der Stilldauer unerheblich. Dennoch wäre natürlich eine Vergleichbarkeit der gemessenen absoluten POP-Konzentrationen mit früheren Untersuchungen wünschenswert. Folgende Aspekte sind bei der Interpretation der beobachteten Diskrepanz zu beachten:

Wie erwähnt, wurden die POP-Werte auf Gesamtfett bezogen, das aus den Plasma-Cholesterin und -Triglycerid-Werten ermittelt wurde ($\text{Gesamtfett} = 2,27 \cdot \text{Chol.} + \text{TG} + 62,3$ bei Werten in mg/dl, PHILLIPS et al. 1989). Diese Methode wird seit langer Zeit vom CDC in Atlanta/USA benutzt (Arbeitsgruppe L. Needham, D. Patterson), z.B. auch bei den nachträglichen Bestimmungen von 2378-TCDD in den asservierten Seveso-Serumproben von

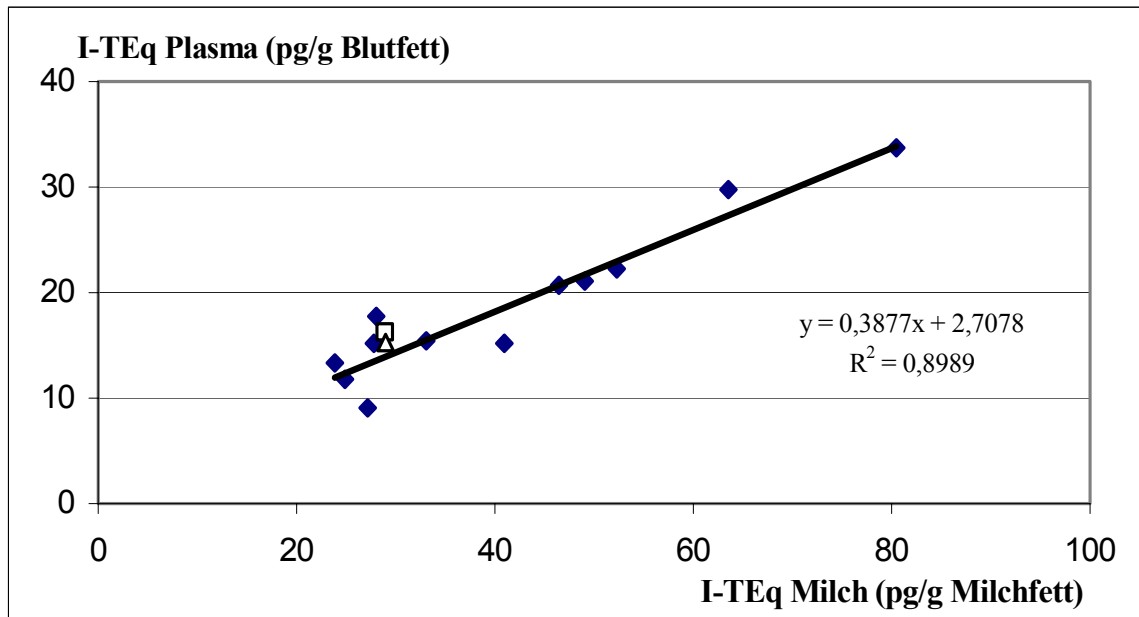


Abbildung 7.e: Korrelation von I-TEq-Werten in Muttermilch und mütterlichem Plasma. Die Muttermilch-Untersuchungen wurden im BgVV Berlin (dunkle Symbole, n=12), beim Lebensmitteluntersuchungsamt Oldenburg (helles Quadrat, n=1), sowie bei der Chemischen Landesuntersuchungsanstalt Freiburg (helles Dreieck, n=1) durchgeführt.

geringem Volumen. Bei der ERGO Forschungsgesellschaft dagegen wird seit Jahren die Vollblutmethode angewandt, bei der eine entsprechende Gesamtfett-Berechnung nicht möglich ist. Es wurde bei ERGO daher bisher auf extrahiertes und gravimetrisch gewogenes Fett bezogen (Blutvolumen in der Routine 40 ml). Ein Vergleich von mit beiden Methoden bestimmten Werten bei Individuen zeigte eine gute Korrelation ($R^2 = 82,4\%$) und durchschnittlich eine gute Übereinstimmung der Einzelwerte (Koeff. der Regressionsgraden 0,94, PÄPKE 1998).

- Durch die für dieses Projekt erforderliche Volumen-Reduktion (Kinder 3-5 ml, Mütter 10 ml Plasma) mit bei der Extraktion erwarteten 20 mg Fett (Kinder) erschien eine gravimetrische Messung zu ungenau. Dennoch wurde sie als zusätzliche Plausibilitätskontrolle durchgeführt. Dabei zeigten sich tatsächlich die erwarteten Probleme: aus einigen Proben wurde erheblich weniger Fett als erwartet extrahiert, Wiederholungsaufarbeitungen (bei den Müttern möglich) ergaben z.T. deutlich höhere Extraktions-Werte; entsprechend stark different waren daher die auf extrahiertes Fett bezogenen POP-Werte. Wurden diese Wiederholungs-Bestimmungen auf nach der Formel berechnetes Gesamtfett bezogen, ergaben sich jedoch fast exakt die gleichen POP-Werte. Es ist daher davon auszugehen, daß durch die Aufarbeitung möglicherweise Fett verloren geht, nicht jedoch POP-Verbindungen verloren gehen.

- Beim Vergleich der nach der Formel erwarteten Gesamtfett-Werte und den extrahierten/gewogenen Fettwerten zeigten sich entsprechend große Streuungen (Abbildungen 7f und 7g), jedoch nicht um den Wert 1: bei den Kindern erreichten die extrahierten Fettwerte durchschnittlich 66,2 %, bei den Müttern 72,5 % der nach der Formel erwarteten Werte.

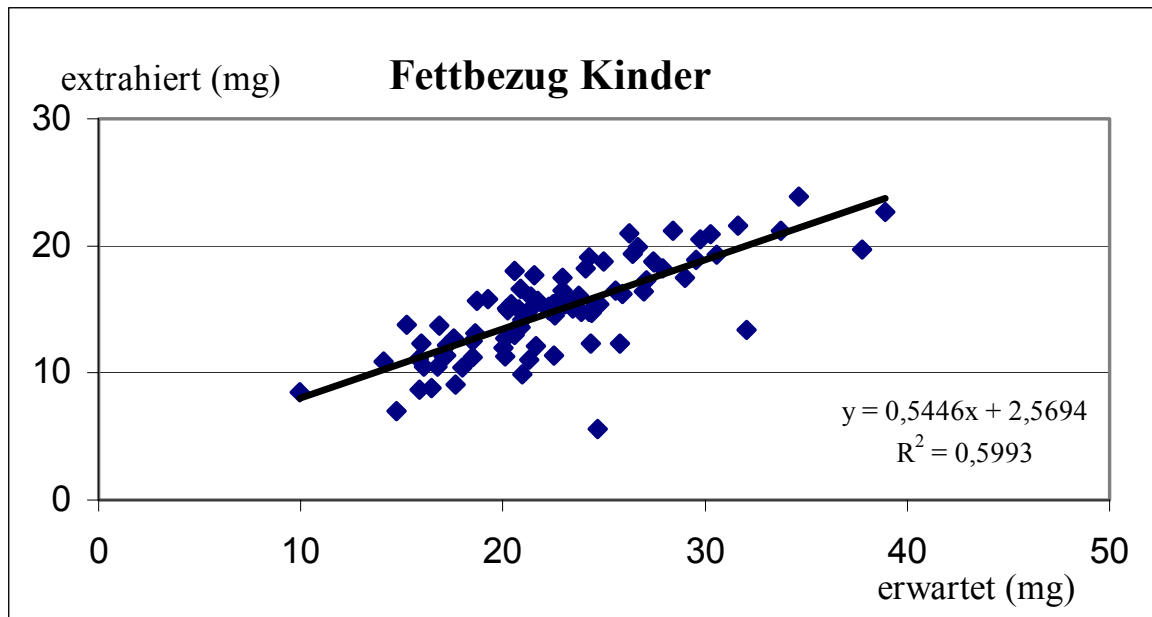


Abbildung 7.f: Korrelation zwischen den aus den **Kinderproben** extrahierten/gewogenen Fettmengen und den erwarteten Fettmengen (nach Formel berechnet).

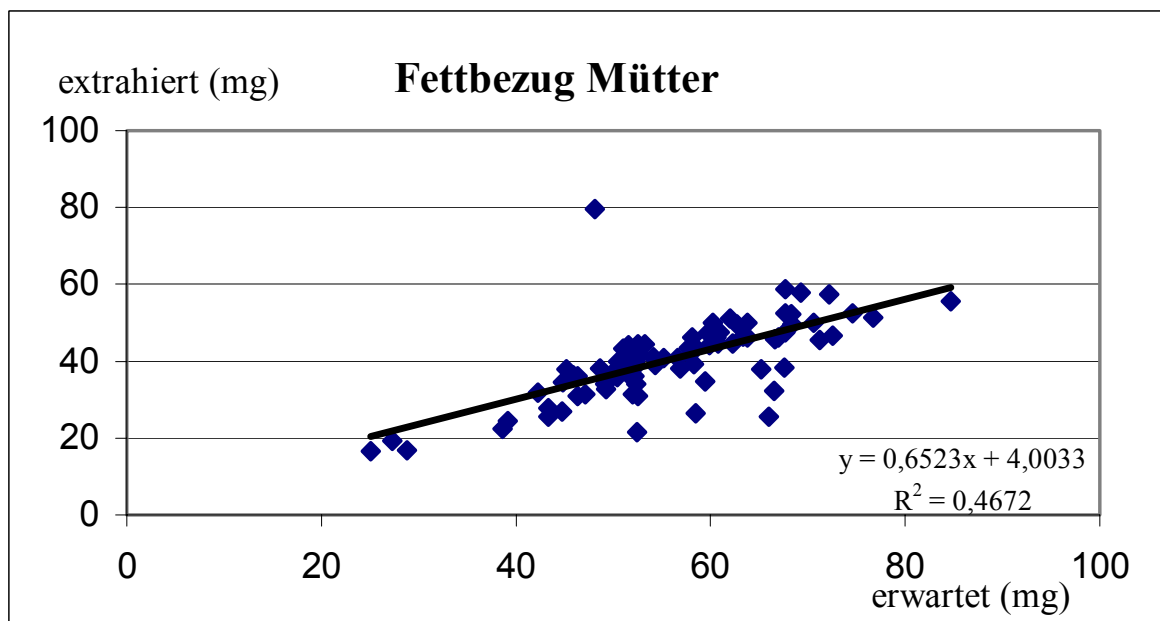


Abbildung 7.g: Korrelation zwischen den aus den mütterlichen Plasmaproben extrahierten/gewogenen Fettmengen und den erwarteten Fettmengen (nach Formel berechnet).

- Entsprechend würden deutlich höhere POP-Werte zu erwarten sein (Kinder: + 51%, Mütter +38%), wenn statt der nach der Formel berechneten Fettmenge für alle Kinder bzw. Mütter ein entsprechender Aufschlag benutzt würde unter der Vorstellung, daß die extrahierten Fettwerte die realistischeren sind, jedoch die individuellen Extraktionswerte zu stark streuen aufgrund der geringen Absolutmenge. Damit wäre ein Teil (ca. 1/3) der Diskrepanz zwischen mütterlichen Milch- und Plasma-Werten erklärt. Für die 21 Mütter der nicht gestillten Kinder würde sich ein I-TEq-Mittelwert von 13,5 ppt (statt 9,8 ppt) ergeben, für die stillenden Mütter aus Berlin ein Median-Wert von 12,8 ppt (statt 9,3 ppt). Diese Werte scheinen insgesamt besser zu den letzten verfügbaren Analysen im Hintergrundbereich von 1996 zu passen: in der Altersgruppe 18-30 Jahre I-TEq-Median 11,9 ppt (n=59), in der Altersgruppe 31-42 Jahre I-TEq-Median 17,1 ppt (n=68, PÄPKE 1998). Eine entsprechende Umrechnung für die gestillten Kinder würde einen I-TEq-Median von 38,2 ppt (statt 25,3 ppt) ergeben; das Kind mit der höchsten Konzentration hätte einen I-TEq-Wert von 162 ppt (statt 107 ppt), einen WHO-TEQ-Wert (PCDD/Fs) von 181 ppt (statt 120 ppt) und einen Gesamt-WHO-TEQ-Wert von 263 ppt (statt 174 ppt).

Zur Klärung der offenen Fragen sind weitere Untersuchungen unter Vergleich von verschiedenen Matrices der gleichen Personen geplant (Muttermilch, Vollblut, Serum und Plasma). Wie häufig bei der Dioxin-Analytik, scheitert die Durchführung einer eigentlich notwendigen größeren Serie an den beträchtlichen Kosten.

8. Ergebnisse: Veränderungen biologischer Parameter durch POPs ?

Als erster Schritt zur Prüfung möglicher Veränderungen biologischer Parameter als Folge der POP-Exposition wurde die statistische Korrelation zwischen den Parametern und den gemessenen POP-Konzentrationen berechnet (Spearman-Rangkorrelations-Analyse zweiseitig). Hierbei wurden zunächst nur die gestillten 80 Kinder berücksichtigt: bei Einbeziehung der nicht gestillten Kinder wird der Konzentrationsbereich nicht wesentlich erweitert, und es treten eventuell Probleme durch mögliche Confounder auf. Gegebenenfalls sollten die nicht gestillten Kinder bei der Gesamt-Interpretation möglicher signifikanter Assoziationen einbezogen werden.

Es wurden 6 wesentliche Verbindungsgruppen bzw. Verbindungen ausgewählt: die I-TEQ-Werte für PCDD/Fs, die Gesamt-WHO-TEQ (worüber auch die coplanaren und mono-ortho-PCBs berücksichtigt werden), die Summe der PCBs 138,153,180 (die ca. 60% der Gesamt-PCBs repräsentieren), sowie als Einzelverbindungen pp-DDE, β -HCH und HCB. Dabei ist zu bedenken, daß die gemessenen Konzentrationen alle signifikant miteinander korrelieren (Tabelle 7b), also nicht unabhängig voneinander sind.

8.1 Körper- und Zahnentwicklung, anamnestische Angaben

In Tabelle 8a sind die Ergebnisse der statistischen Prüfung zusammengestellt für 6 Parameter der Körper- und Zahnentwicklung sowie für 14 Items, die anamnestische Angaben zu Hautproblemen und Infekten betreffen (Spearman-Korrelations-Koeffizient und p-Wert). Von den 120 durchgeführten statistischen Analysen ergaben 9 p-Werte unter 0,05, davon 3 mit p-Werten unter 0,01. Bei den PCDD/Fs (I-TEQ und Gesamt-WHO-TEQ) gab es dabei keine signifikanten Ergebnisse.

Mit einem p-Wert an der Signifikanzgrenze (0,041) waren kindlicher Body mass index (BMI) und Summe der PCBs negativ assoziiert. Bei den erhobenen anamnestischen Angaben gab es keine mit signifikanter Assoziation zum BMI, so daß die Berücksichtigung dieser Faktoren nicht weiter führte. Wahrscheinlich ist nicht der statistisch kleinere BMI Folge der höheren PCB-Exposition, sondern die höheren PCB-Werte Folge einer geringeren Fettmassen-Zunahme (Konzentrationseffekt). Auch die anderen Verbindungen/Verbindungsgruppen waren alle negativ mit dem BMI assoziiert, jedoch nicht signifikant.

Keine signifikanten Assoziationen konnten zwischen POPs und dem ersten Zahndurchbruch bzw. der Anzahl der Zähne festgestellt werden. Von einer finnischen Arbeitsgruppe war ein negativer Zusammenhang zwischen TEQ und schlechterer Zahnmineralisation publiziert worden (ALALUUSUA et al., 1996; ALALUUSUA et al., 1999). Kein Zusammenhang fand sich zwischen POP-Konzentrationen und aktuellen bzw. berichteten Hautproblemen.

Tabelle 8.a: Koeffizienten (oben) und p-Werte (unten) der Korrelations-Analyse (Spearman zweiseitig) von POP-Verbindungen bzw. -Verbindungsgruppen und Parametern der Körper- und Zahnentwicklung sowie anamnestischen Angaben zu Hautproblemen und Infekten (jeweils n=80). Signifikante Korrelationen ($p < 0,05$) sind grau unterlegt.

POP-Verb./Verbind.gr.	I-TEq (ppt)	Gesamt- WHO- TEQ (ppt)	Σ PCB 138,153, 180 (ppb)	DDE (ppb)	β -HCH (ppb)	HCB (ppb)
Parameter						
Körpergewicht (kg)	-0,112 0,321	-0,093 0,413	-0,204 0,069	-0,022 0,845	-0,166 0,142	-0,087 0,441
Körperlänge (cm)	-0,003 0,977	0,089 0,430	0,028 0,803	-0,002 0,985	0,029 0,798	0,008 0,944
Kopfumfang (cm)	-0,058 0,608	0,101 0,371	0,071 0,534	-0,143 0,204	0,031 0,788	0,042 0,713
Body mass index (kg/m^2)	-0,158 0,162	-0,182 0,106	-0,229 0,041*	-0,038 0,736	-0,192 0,088	-0,134 0,238
Zähne: erster mit (Monate)	0,061 0,591	0,005 0,962	0,037 0,744	0,096 0,395	0,034 0,768	0,014 0,905
Zähne: Anzahl bei Untersuchung	-0,154 0,172	-0,110 0,333	-0,049 0,667	-0,121 0,285	-0,153 0,174	-0,128 0,257
leichte atop. Dermatitis bei U.	0,100 0,380	0,048 0,672	0,129 0,256	0,189 0,093	0,216 0,055	0,146 0,195
(fragl.) früher atop. Dermatitis	-0,041 0,716	-0,113 0,320	-0,014 0,899	0,094 0,405	0,031 0,783	0,026 0,821
jemals Hautprobleme angegeben	-0,047 0,679	-0,118 0,296	-0,009 0,934	0,058 0,608	0,053 0,639	-0,013 0,907
erster Infekt mit (Monate)	0,091 0,420	0,109 0,336	0,113 0,318	0,202 0,073	0,195 0,083	0,320 0,004**
Anzahl Infekte insgesamt	-0,091 0,422	-0,134 0,237	-0,106 0,351	-0,182 0,106	-0,222 0,047*	-0,198 0,078
Anzahl Infekte mit Fieber	0,008 0,942	-0,110 0,332	-0,189 0,092	0,020 0,858	-0,242 0,031*	-0,161 0,153
Otitis media jemals	-0,056 0,623	-0,136 0,229	-0,268 0,016*	-0,003 0,977	-0,101 0,372	-0,132 0,242
Pneumonie/antib.beh.Br. jemals	-0,092 0,417	-0,173 0,124	-0,294 0,008**	0,005 0,962	-0,116 0,304	-0,034 0,763

Tabelle 8a (Fortsetzung)

POP-Verb./Verbind.gr.	I-TEq	Gesamt- WHO- TEQ	Σ PCB 138,153, 180	DDE	β-HCH	HCB
Parameter	(ppt)	(ppt)	(ppb)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
Durchfallerkrankung jemals	-0,089 0,432	-0,056 0,624	0,084 0,460	-0,126 0,265	-0,017 0,879	-0,078 0,490
jemals Antibiotikum	0,001 0,992	-0,163 0,149	-0,363 0,001**	0,037 0,743	-0,198 0,078	-0,137 0,226
3-Tage-Fieber gehabt	0,067 0,552	0,006 0,954	0,056 0,619	0,033 0,771	0,067 0,552	-0,022 0,846
Windpocken gehabt	0,003 0,982	-0,064 0,571	-0,212 0,060	-0,081 0,473	-0,251 0,025*	-0,218 0,052
Soor im Windelbereich gehabt	0,008 0,943	-0,012 0,913	-0,123 0,275	-0,073 0,522	-0,001 0,992	-0,005 0,962
Soor im Mundbereich gehabt	-0,102 0,368	-0,146 0,197	-0,169 0,133	-0,213 0,057	-0,237 0,034*	-0,201 0,074

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

Acht der gefundenen signifikanten Korrelationen betrafen die bisherigen Infekte und wiesen alle in die gleiche Richtung: je höher die POP-Werte (Summe PCBs, β-HCH, HCB), desto später trat der erste Infekt bzw. um so seltener trat die jeweilige Infektion auf und um so seltener wurde ein Antibiotikum verordnet. Natürlich schützen POPs nicht vor Infektionen. Die 3 auffälligen Assoziationen mit der Summe der PCBs sind vermutlich dadurch bedingt, daß im Mittel die Ilsenburger Kinder häufiger bestimmte Infektionen hatten bzw. ihnen häufiger Antibiotika verordnet wurden (4.3., Tabelle 4b), während gleichzeitig die meisten PCB-Verbindungen in der Region Ilsenburg in niedrigerer Konzentration gemessen wurden (7.1.). Bei Einbeziehung des Faktors "Region Ilsenburg" in ein lineares Regressionsmodell hat die Summe der PCBs in keinem der genannten Fälle mehr einen signifikanten Einfluß. Die Ursache für die anamnestiche Häufung von Otitiden und Pneumonien/schweren Bronchitiden und die dadurch bedingte häufigere Verordnung von Antibiotika in der Region Ilsenburg konnte nicht geklärt werden. Ein Zusammenhang mit höheren PCDD/PCDF-Werten bestand nicht.

Die Assoziation zwischen der Zahl der bisherigen Infekte bzw. der Zahl der bisherigen Infekte mit Fieber und den β-HCH-Werten war bei Einbeziehung der Anzahl der Geschwister (jünger als 6 Jahre, mutmaßliche Hauptinfektionsquelle) bei multivariater Prüfung nicht mehr signifikant. Gleiches gilt für die Assoziation von HCB mit dem Alter beim ersten Infekt, und für die Assoziation von β-HCH mit der Angabe, ob das Kind bereits Windpocken oder Mundsoor gehabt hatte: in allen Fällen lag bei Berücksichtigung dieses Confounders (Anzahl Geschwister) keine Signifikanz mehr vor. Dies ist nicht zufällig bedingt, sondern durch die signifikant negative Korrelation zwischen Geschwister-Zahl und kindlicher HCB- bzw. β-HCH-Konzentration bedingt (Spearman-Analyse: p jeweils 0,003; je mehr Geschwister,

meistens ebenfalls lange gestillt, desto niedriger der POP-Wert). In einem linearen Modell für die Anzahl der Infekte insgesamt hatte β -HCH keinen signifikanten Einfluß mehr ($\beta=-0,106$, $p=0,285$), während der Einfluß von Anzahl der Geschwister jünger als 6 Jahre hochsignifikant war ($\beta=0,517$, $p<0,001$). Entsprechend gab es keine signifikanten Korrelationen zwischen POPs und Parametern der Infektions-Anamnese bei Beschränkung auf die 52 gestillten Kinder ohne Geschwister im Kleinkindalter.

8.2 Biologische Parameter

In Tabelle 8b sind entsprechend Tabelle 8a die Ergebnisse der statistischen Prüfung für die wichtigsten 73 gemessenen biologischen Parameter zusammengestellt (bei den Lymphozyten-Subpopulationen wurde eine Beschränkung auf die wichtigsten Parameter vorgenommen). Von den 438 durchgeführten statistischen Analysen ergaben 16 p-Werte unter 0,05, davon keine mit p-Wert unter 0,01. Die 16 signifikanten Assoziationen betrafen I-TEq, Gesamt-WHO-TEQ und HCB jeweils einmal, β -HCH zweimal, die PCB-Summe viermal und pp-DDE siebenmal. Im folgenden werden diese Assoziationen hinsichtlich weiterer Einflußfaktoren betrachtet. Hierfür gibt es keine festgelegten Verfahren, sondern bei jedem Item-Paar (biologischer Parameter – POP-Verbindung) muß geprüft werden, welche Parameter als mögliche Confounder in Frage kommen und in die multivariate Analyse einbezogen werden müssen.

8.2.1 Klinische Chemie

Bei den Parametern der klinischen Chemie zeigten sich (grenzwertig) signifikante Assoziationen zwischen Albumin und pp-DDE (positiv), sowie zwischen Cholesterin bzw. Eisen und der Summe PCBs 138, 153, 180 (negativ). Diese Parameter sind u.a. durch die Ernährung beeinflusst, die sich bei den Müttern aus der Region Ilseburg und Berlin unterscheidet (Tabelle 4b).

Die multivariate Betrachtung der Albumin-Werte zeigte bei zusätzlicher Einbeziehung der äquivalenten Vollstilldauer sowie des mütterlichen Fleischverzehr (siehe 6.2.4.) weiterhin einen signifikanten pp-DDE-Einfluß ($p=0,011$), die Stilldauer hatte einen ähnlich großen Einfluß ($p=0,013$). Der mütterliche Fleischkonsum war in diesem Modell (Varianzaufklärung 13,2 %) nicht signifikant ($p=0,689$). Bei Einbeziehung der unterschiedlichen Ernährungsweisen über den Faktor Region Ilseburg (statt Fleischkonsum der Mutter) ergab sich eine deutlich höhere Varianzaufklärung ($R^2 = 22,5$ %) mit hochsignifikantem Einfluß dieses Faktors ($p=0,003$), während weder die Stilldauer ($p=0,320$) noch pp-DDE ($p=0,186$) einen signifikanten Einfluß hatten. Es erscheint möglich, daß in der Region Ilseburg weitere, nicht erfaßte Ernährungsfaktoren einen Einfluß auf die Albumin-Werte haben, und so die signifikante Assoziation von pp-DDE- und Albumin-Werten nur vorgetäuscht wird.

Tabelle 8.b: Koeffizienten (oben) und p-Werte (unten) der Korrelations-Analyse (Spearman zweiseitig) von POP-Verbindungen bzw. -Verbindungsgruppen und den wichtigsten gemessenen biologischen Parametern (jeweils n=80, nur bei Chemilumineszenz n=77). Signifikante Korrelationen (p<0,05) sind grau unterlegt.

POP-Verb./Verbind.gr.	I-TEq (ppt)	Gesamt- WHO- TEQ (ppt)	Σ PCB 138,153, 180 (ppb)	DDE (ppb)	β-HCH (ppb)	HCB (ppb)
Parameter						
Klinische Chemie						
Gesamteiweiß (g/dl)	-0,029 0,796	-0,075 0,511	-0,173 0,124	-0,013 0,906	-0,151 0,180	-0,100 0,375
Albumin (g/dl)	0,158 0,163	0,005 0,964	-0,199 0,077	0,231 0,039*	-0,045 0,694	0,064 0,576
Prealbumin (mg/dl)	0,121 0,286	-0,006 0,960	-0,132 0,245	0,128 0,259	-0,012 0,915	0,062 0,584
Eisen (μmol/l)	-0,065 0,569	-0,152 0,178	-0,231 0,039*	-0,134 0,238	-0,203 0,071	-0,116 0,306
Ferritin (μg/l)	-0,141 0,211	-0,134 0,235	-0,035 0,758	-0,093 0,409	0,005 0,968	0,053 0,638
Transferrin (mg/dl)	0,078 0,491	-0,017 0,879	-0,047 0,681	0,053 0,640	-0,081 0,477	-0,024 0,836
lösl. Transferrin-Rezeptor (mg/l)	-0,070 0,540	-0,059 0,604	-0,137 0,227	-0,034 0,762	0,114 0,313	-0,016 0,891
Cholesterin (mg/dl)	-0,057 0,617	-0,120 0,289	-0,242 0,031*	0,081 0,474	-0,039 0,730	0,012 0,918
Triglyceride (mg/dl)	-0,108 0,340	-0,077 0,499	-0,024 0,835	-0,024 0,830	0,021 0,854	-0,071 0,531
Gesamtbilirubin (mg/dl)	-0,091 0,420	-0,067 0,553	-0,116 0,306	-0,023 0,837	-0,121 0,286	-0,031 0,785
ALT (U/l)	-0,066 0,563	-0,002 0,986	0,032 0,776	0,010 0,927	0,045 0,690	0,014 0,902
γ-GT (U/l)	-0,118 0,297	-0,158 0,161	-0,196 0,081	-0,040 0,726	-0,019 0,864	0,084 0,461
LDH (U/l)	0,160 0,156	0,104 0,357	-0,085 0,454	0,182 0,106	0,120 0,287	0,122 0,279
Vit. E (α-Tocopherol, mg/l)	-0,114 0,316	-0,162 0,151	-0,163 0,149	0,100 0,376	-0,044 0,699	-0,012 0,913
Vit. A (Retinol, mg/l)	0,114 0,315	-0,012 0,915	-0,091 0,424	0,171 0,128	0,134 0,237	0,195 0,083

Tabelle 8b (Fortsetzung)

POP-Verb./Verbind.gr.	I-TEq	Gesamt- WHO- TEQ	Σ PCB 138,153, 180	DDE	β-HCH	HCB
Parameter	(ppt)	(ppt)	(ppb)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
Schilddrüsenparameter						
Gesamt-T ₃ (ng/ml)	0,034	0,077	0,051	0,055	0,084	0,131
	0,762	0,498	0,653	0,628	0,461	0,246
Gesamt-T ₄ (µg/dl)	0,244	0,209	0,094	0,195	0,272	0,233
	0,029*	0,063	0,405	0,083	0,015*	0,038*
TSH (µU/ml)	-0,019	0,022	0,055	0,056	0,131	0,038
	0,869	0,850	0,630	0,620	0,247	0,739
TBG (µg/ml)	0,027	0,109	0,182	0,024	0,094	0,064
	0,814	0,336	0,106	0,835	0,406	0,573
freies T ₄ (ng/dl)	0,213	0,123	-0,055	0,149	0,203	0,197
	0,058	0,277	0,630	0,186	0,070	0,080
Jod-Ausscheid. Urin (µg/dl)	-0,081	-0,063	-0,175	-0,100	0,057	0,093
	0,475	0,577	0,121	0,378	0,618	0,410
Immunglobuline						
IgA (mg/dl)	-0,015	0,065	0,198	-0,192	-0,017	-0,128
	0,891	0,564	0,078	0,088	0,884	0,257
IgM (mg/dl)	-0,153	-0,139	-0,055	-0,010	-0,066	-0,160
	0,175	0,219	0,631	0,929	0,559	0,156
IgG (mg/dl)	-0,065	0,025	0,122	-0,269	-0,066	-0,152
	0,566	0,826	0,283	0,016*	0,560	0,177
IgG ₁ (mg/dl)	-0,086	0,009	0,112	-0,283	-0,080	-0,161
	0,446	0,937	0,324	0,011*	0,478	0,153
IgG ₂ (mg/dl)	-0,198	-0,190	-0,030	-0,277	-0,121	-0,216
	0,078	0,091	0,789	0,013*	0,283	0,055
IgG ₃ (mg/dl)	0,009	0,071	0,135	-0,249	0,057	-0,094
	0,936	0,532	0,231	0,026*	0,616	0,407
IgG ₄ (mg/dl)	-0,129	-0,086	-0,098	-0,075	-0,120	-0,180
	0,255	0,447	0,386	0,506	0,290	0,111
IgE (KU/l)	0,121	0,090	0,002	-0,103	0,021	0,039
	0,283	0,427	0,983	0,365	0,856	0,729

Tabelle 8b (Fortsetzung)

POP-Verb./Verbind.gr.	I-TEq	Gesamt- WHO- TEQ	Σ PCB 138,153, 180	DDE	β-HCH	HCB
Parameter	(ppt)	(ppt)	(ppb)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
Blutbild						
Leukozyten (k/μl)	0,107 0,344	0,069 0,543	-0,084 0,458	0,007 0,954	0,042 0,710	0,065 0,567
Neutrophile (k/μl)	0,027 0,815	0,018 0,872	0,016 0,891	0,041 0,720	0,009 0,939	0,112 0,324
Lymphozyten (k/μl)	0,104 0,361	0,033 0,774	-0,182 0,106	-0,058 0,611	0,006 0,960	-0,042 0,711
Monozyten (k/μl)	0,128 0,259	0,187 0,097	0,235 0,036*	0,054 0,636	0,143 0,206	0,140 0,215
Eosinophile (k/μl)	0,020 0,864	0,026 0,822	-0,035 0,757	0,082 0,467	0,015 0,894	0,032 0,775
Basophile (k/μl)	0,118 0,295	0,029 0,802	-0,038 0,741	0,017 0,883	-0,012 0,917	0,021 0,854
Erythrozyten (M/μl)	-0,041 0,718	-0,062 0,582	-0,182 0,106	-0,072 0,526	-0,139 0,217	-0,102 0,370
Hämoglobin (g/dl)	0,065 0,567	-0,030 0,794	-0,187 0,097	0,002 0,989	-0,136 0,229	0,009 0,939
MCV (fl)	-0,053 0,638	-0,149 0,186	-0,178 0,113	-0,002 0,983	-0,137 0,225	-0,004 0,973
MCH (pg)	0,065 0,566	-0,015 0,896	-0,055 0,629	0,040 0,728	-0,061 0,591	0,054 0,633
Retikulozyten (‰)	-0,059 0,605	-0,079 0,485	-0,012 0,914	0,076 0,501	0,059 0,606	0,044 0,697
Thrombozyten (K/μl)	-0,010 0,928	-0,044 0,701	-0,176 0,120	-0,082 0,472	-0,040 0,726	0,022 0,847
Zytokin-Prod. n. PHA-Stim.						
IFN PHA-PBMCs 2d (pg/ml)	0,130 0,254	0,130 0,254	0,082 0,475	0,058 0,611	0,098 0,390	0,006 0,962
IL-5 PHA-PBMCs 2d (pg/ml)	-0,009 0,938	0,044 0,702	0,063 0,583	0,019 0,870	0,076 0,507	0,130 0,253
IL-10 PHA-PBMCs 2d (pg/ml)	0,096 0,402	0,051 0,654	0,082 0,471	-0,128 0,259	0,057 0,616	0,091 0,427

Tabelle 8b (Fortsetzung)

POP-Verb./Verbind.gr.	I-TEq	Gesamt- WHO- TEQ	Σ PCB 138,153, 180	DDE	β-HCH	HCB
Parameter	(ppt)	(ppt)	(ppb)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
Lymphozyten-Hauptpopulat.						
T-Zellen (CD3 ⁺ , %Lymph.)	0,073 0,518	0,074 0,517	0,084 0,459	0,006 0,958	-0,067 0,553	0,014 0,902
T-Suppr.-Z. (CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %L.)	0,022 0,844	-0,072 0,527	-0,074 0,516	0,004 0,971	-0,160 0,155	-0,127 0,260
T-Help.-Z. (CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %L.)	0,009 0,934	0,079 0,484	0,146 0,196	-0,045 0,690	0,029 0,800	0,028 0,806
CD4/CD8 (T-Lymphozyten)	-0,034 0,767	0,078 0,493	0,115 0,308	-0,054 0,637	0,124 0,275	0,093 0,414
B-Zellen (CD19 ⁺ , %L.)	-0,039 0,733	-0,100 0,379	-0,160 0,156	-0,036 0,749	-0,029 0,799	-0,029 0,800
T/B-Ratio (CD3/CD19)	0,044 0,695	0,088 0,436	0,152 0,177	0,029 0,798	-0,002 0,982	0,012 0,918
NK-Z. (CD3 ⁻ CD56/CD16 ⁺ , %L)	-0,067 0,558	-0,068 0,549	-0,053 0,642	0,141 0,213	0,003 0,981	0,002 0,988
Lymphozyten-Subpopulat.						
TCRγδ ⁻ αβ ⁺ (%CD2 ⁺ -Lymph.)	0,155 0,171	0,022 0,845	-0,131 0,248	0,110 0,331	0,097 0,392	0,147 0,192
CD25 ⁺ (%CD4 ⁺ -Lymphozyten)	-0,055 0,625	-0,025 0,823	-0,057 0,614	-0,139 0,217	-0,006 0,956	0,013 0,907
HLA ⁺ (%CD4 ⁺ -Lymphozyten)	-0,040 0,725	-0,109 0,335	-0,077 0,496	-0,021 0,852	0,047 0,680	0,034 0,765
CD29 ^{hi} (%CD4 ⁺ -L.)	-0,126 0,264	-0,182 0,105	-0,144 0,203	-0,163 0,148	-0,069 0,544	-0,099 0,380
CD29 ^{hi} CD49d ^{hi} (%CD4 ⁺ -L.)	-0,106 0,350	-0,163 0,150	-0,106 0,350	-0,141 0,211	-0,002 0,986	-0,124 0,273
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ (%CD4 ⁺ -L.)	-0,004 0,973	0,012 0,913	0,127 0,262	0,031 0,787	0,050 0,661	0,016 0,888
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻ (%CD8 ⁺ -L.)	0,012 0,912	0,047 0,678	0,096 0,396	0,028 0,808	0,076 0,504	0,022 0,849
CD25 ⁺ (%CD8 ⁺ -Lymphozyten)	-0,162 0,151	-0,185 0,101	-0,184 0,101	-0,007 0,952	-0,123 0,276	-0,241 0,031

Tabelle 8b (Fortsetzung)

POP-Verb./Verbind.gr.	I-TEq	Gesamt- WHO- TEQ	Σ PCB 138,153, 180	DDE	β-HCH	HCB
Parameter	(ppt)	(ppt)	(ppb)	(ppb)	(ppb)	(ppb)
Lymphozyten-Subpopulat.						
HLA ⁺ (%CD8 ⁺ -Lymphozyten)	0,038 0,739	0,092 0,419	0,155 0,169	-0,078 0,493	0,005 0,962	-0,066 0,561
CD11a ^{hi} (%CD8 ⁺ -Lymph.)	-0,028 0,803	-0,041 0,717	-0,116 0,304	0,002 0,983	0,046 0,682	-0,036 0,753
CD8 ^{hi} CD11a ^{lo} (% Lymph.)	-0,050 0,660	-0,123 0,276	-0,092 0,418	-0,011 0,923	-0,216 0,055	-0,155 0,170
CD56 ⁺ CD57 ⁺ (%CD8 ^{hi} -L.)	-0,012 0,914	-0,017 0,885	-0,077 0,499	-0,066 0,566	-0,075 0,513	-0,130 0,255
CD27 ⁻ (%CD8 ^{hi} -Lymph.)	0,084 0,458	0,088 0,439	0,028 0,808	0,069 0,544	0,038 0,735	0,031 0,788
CD21 ⁺ (%CD19 ⁺ -Lymph.)	-0,159 0,160	-0,231 0,039*	-0,248 0,027*	-0,250 0,026*	-0,047 0,679	-0,134 0,237
Lymphozyten-Proliferation						
PHA max. (cpm)	0,055 0,631	0,075 0,513	0,012 0,914	-0,172 0,129	0,080 0,482	0,096 0,399
ConA max. (cpm)	0,045 0,694	0,056 0,624	-0,031 0,788	-0,154 0,176	0,019 0,868	-0,028 0,805
PWM max. (cpm)	0,119 0,294	0,182 0,108	0,188 0,098	-0,131 0,251	0,026 0,821	0,018 0,878
Candida max. (cpm)	-0,084 0,461	-0,170 0,135	-0,140 0,220	-0,166 0,144	-0,174 0,125	-0,212 0,061
SEB max. (cpm)	-0,110 0,336	-0,175 0,124	-0,290 0,010	0,006 0,959	-0,155 0,173	0,016 0,886
Tetanus max. (cpm)	0,028 0,805	0,034 0,766	-0,081 0,479	-0,257 0,022*	-0,052 0,650	-0,131 0,248
Diphtherie max. (cpm)	0,079 0,487	0,027 0,814	-0,121 0,287	-0,145 0,204	0,000 0,999	-0,030 0,795
Granulozyten-Funktion						
Chemilumineszenz (Max. E/t)	-0,101 0,383	-0,102 0,376	-0,181 0,115	-0,071 0,538	-0,230 0,044*	-0,211 0,065

* p < 0,05; ** p < 0,01

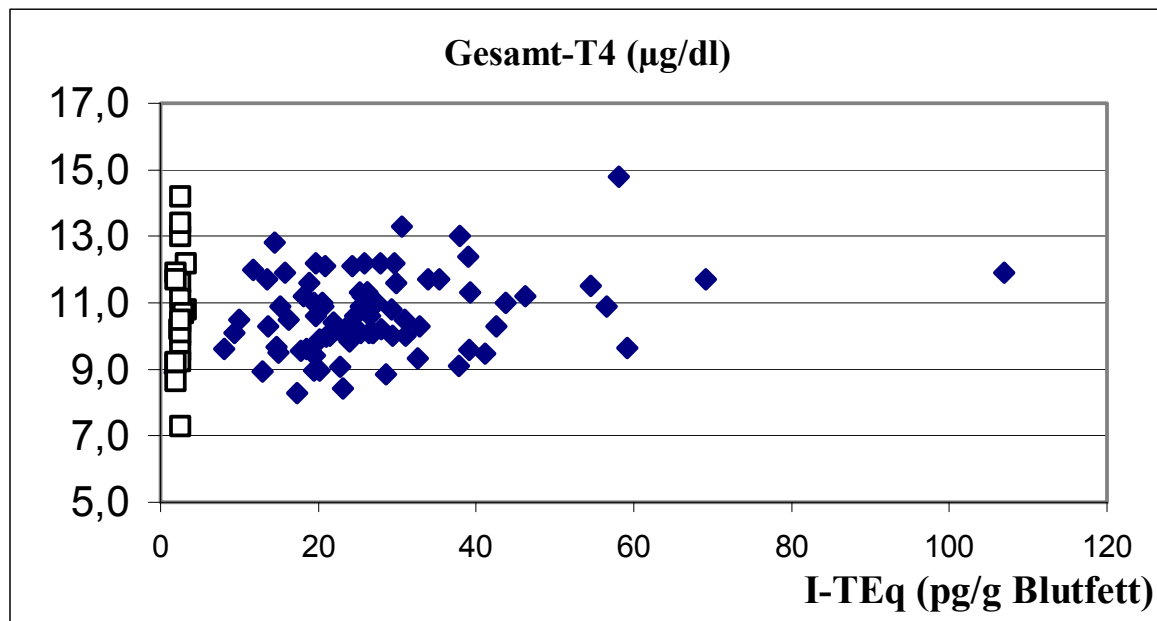


Abbildung 8.a: Streudiagramm von Gesamt-Thyroxin (T_4) und I-TEq-Werten. Neben den gestillten Kindern (dunkle Symbole) sind als zusätzliche Information auch die bei den statistischen Analysen nicht berücksichtigten nicht gestillten Kinder dargestellt (helle Symbole, bei Kindern ohne POP-Einzelanalyse wurden die I-TEq-Werte der Pool-Analyse verwendet).

Die multivariate Betrachtung der Plasma-Spiegel von Eisen zeigte bei zusätzlicher Einbeziehung der äquivalenten Vollstilldauer sowie des mütterlichen Fleischverzehr (siehe 6.2.4.) und des mit sensibler Methode gemessenen CrPs (sCrP, siehe 6.2.3.) einen hochsignifikanten Einfluß des sCrPs, während in diesem Modell ($R^2 = 20,0 \%$) weder die beiden erstgenannten Faktoren noch die Summe der PCBs ($p=0,293$) einen signifikanten Einfluß hatten. Bei Betrachtung der signifikant negativen Assoziation von (Gesamt-)Cholesterin und der Summe PCBs 138, 153, 180 fielen 6 Kinder mit pathologisch hohen Werten von mehr als 200 mg/dl auf (siehe 6.2.6). In vier Fällen waren die Mütter in der DDR geboren, so daß die Kinder relativ niedrige PCB-Werte hatten. Wurden bei der Spearman-Korrelationsanalyse diese Kinder ausgeschlossen, so bestand keine signifikante Assoziation mehr ($p=0,106$).

8.2.2 Schilddrüsenhormone

Wie aus Tabelle 8b zu ersehen ist, konnten für die meisten Schilddrüsen-Parameter keine signifikanten Assoziationen mit Konzentrationen von POP-Verbindungen beobachtet werden. Signifikant positive Assoziationen wurden festgestellt zwischen dem Schilddrüsenhormon Gesamt-Thyroxin (T_4) und den Werten für β -HCH, HCB und I-TEq (Abbildung 8a, mit Darstellung der nicht gestillten Kinder, die jedoch nicht bei den statistischen Berechnungen berücksichtigt wurden). Für alle drei POP-Verbindungen/-Verbindungsgruppen lagen keine statistisch signifikanten Assoziationen mit den Quotienten T_4/TSH und T_4/TBG vor. Der mit 14,8 $\mu\text{g/dl}$ höchste Gesamt-Thyroxin-Wert stammt von dem Berliner Kind mit dem höchsten I-TEq-Wert (58,1 ppt), das in letzter Zeit relativ wenig an Gewicht zugenommen hatte und

auch hohe Albumin und TBG-Werte hatte (vermutlich gewisser Flüssigkeitsmangel; dadurch bedingt hohe Protein-Werte, die ein hohes Gesamt-Thyroxin nach sich ziehen). Ohne dieses Kind lagen die T_4 -Werte der gestillten Kinder innerhalb der Streubereichs der nicht gestillten Kinder (Abbildung 8a). Wie aus physiologischen Gründen zu erwarten, waren die Gesamt-Thyroxin-Werte stark vom Thyroxin-bindenden Globulin (TBG) abhängig (Spearman Korrelations-Koeffizient 0,535, $p < 0,001$; Prealbumin=Transthyretin korrelierte nicht signifikant), daß selbst nicht mit einem der POPs korrelierte. Bei univariater Betrachtung fanden sich zudem signifikant höhere T_4 -Werte bei Kindern, die bereits eine Krippe oder eine Tagesmutter besuchten (Mann-Whitney-Test: $p = 0,008$), und bei Kindern mit Infektzeichen bei der Blutentnahme (Mann-Whitney-Test: $p = 0,049$), was jeweils Streß-bedingt sein könnte. Bei multivariater Betrachtung mit Einschluß dieser beiden Faktoren (mit oder ohne TBG) blieb statistisch ein signifikanter Einfluß der I-TEq-Werte auf die T_4 -Werte bestehen. Gleiches gilt für die Betrachtung von β -HCH und HCB (nur wenn TBG nicht berücksichtigt wird). Die gleichsinnige signifikante Assoziation der 3 genannten POPs dürfte Folge der relativ starken Korrelationen untereinander sein (Tabelle 7b).

Die besprochene leicht signifikante Assoziation der drei POP-Verbindungen/-Verbindungsgruppen mit Gesamt-Thyroxin dürfte am ehesten zufällig bedingt sein. Ein möglicher Einfluß

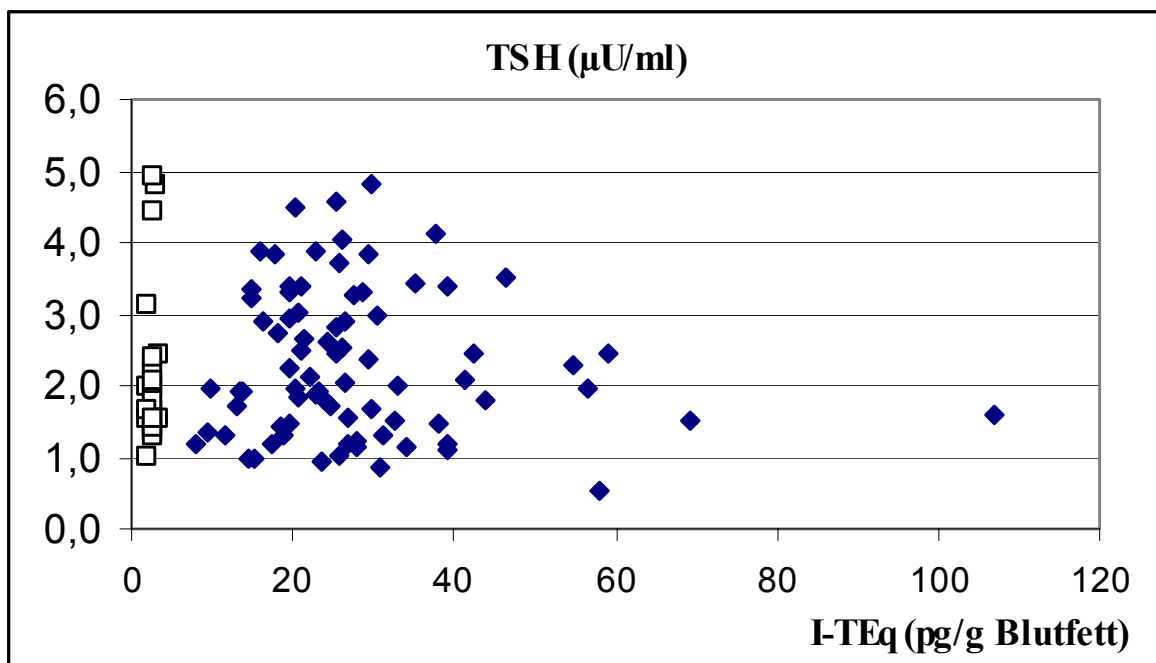


Abbildung 8.b: Streudiagramm von Thyroid-stimulierenden Hormon (TSH) und I-TEq-Werten. Neben den gestillten Kindern (dunkle Symbole) sind als zusätzliche Information auch die bei den statistischen Analysen nicht berücksichtigten nicht gestillten Kinder dargestellt (helle Symbole, bei Kindern ohne POP-Einzelanalyse wurden die I-TEq-Werte der Pool-Analyse verwendet).

von POPs auf die Schilddrüsenfunktion von Säuglingen ist in den letzten Jahren insbesondere in Zusammenhang mit den Untersuchungen einer niederländischen und einer japanischen Arbeitsgruppe diskutiert worden (siehe 1.1.). Interpretiert wurden diese Ergebnisse und die von Tierexperimenten mit weit höheren POP-Konzentrationen dahingehend, daß möglicherweise durch Dioxine und PCBs eine Induktion von Thyroxin-abbauenden Enzymen in der Leber stattfindet, die zu erniedrigten Konzentrationen der peripheren Schilddrüsenhormone führt, bzw. bei intaktem Regelkreis eine Kompensation mit normalen peripheren Hormonwerten bei erhöhtem TSH bewirkt. In der jetzt vorliegenden Untersuchung konnten, wie beschrieben, die Ergebnisse der o.g. Arbeitsgruppen nicht bestätigen; es zeigte sich sogar eher eine gegenteilige Tendenz.

8.2.3 Humorales Immunsystem

Wie aus Tabelle 8b zu ersehen ist, konnten für die Haupt-Immunglobulin-Klassen und für die IgG-Subklassen keine signifikanten Assoziationen mit Konzentrationen von POP-Verbindungen beobachtet werden. Eine Ausnahme macht die signifikante Assoziation zwischen Immunglobulin G (IgG) und dem DDT-Abbauprodukt pp-DDE (Spearman Korr.koeff. -0,269, $p=0,016$), das von allen POP-Verbindungen durchschnittlich mit der höchsten Konzentration vorliegt (Tabelle 7a). Graphisch ist die Korrelation in Abbildung 8c dargestellt (gestillte Kinder differenziert nach Geburtsort der Mutter, zusätzlich Darstellung der nicht gestillten Kinder, die jedoch nicht bei den statistischen Berechnungen berücksichtigt wurden). Zwar liegt insgesamt eine negative Korrelation vor, es fällt jedoch auf, daß niedrige IgG-Werte auch bei Kindern mit niedrigen pp-DDE gefunden werden (eine Untergrenze von 200 mg/dl wird nicht unterschritten). Bei Einbeziehung der nicht gestillten Kinder war die Assoziation gerade nicht mehr signifikant (Spearman Korrelations-Koeffizient -0,191, $p=0,056$; für Kinder ohne Einzelanalyse wurde der Wert der Pool-Analyse berücksichtigt). Die niedrigeren IgG-Werte sind nicht Folge einer isolierten Erniedrigung von Werten einer der vier IgG-Subklassen, sondern entstehen durch anteilmäßig gleiche Beteiligung der quantitativ wichtigsten Klassen IgG₁, IgG₂ und IgG₃ (Tabelle 8b). Für die komplexeren Analysen wird daher im folgenden lediglich Gesamt-IgG betrachtet.

Bei der Suche nach weiteren Einflußfaktoren für IgG (Spearman-Korrelationsanalyse) fand sich erwartungsgemäß ein hochsignifikanter Zusammenhang mit der Zahl der bisherigen Infekte ($p=0,004$); die bei der Untersuchung beobachteten klinischen Infektzeichen waren gerade nicht mehr signifikant ($p=0,055$), noch weniger Einfluß hatte das mit sensibler Methode gemessene CrP ($p=0,138$). Überraschenderweise fand sich jedoch auch eine signifikante Abhängigkeit der IgG-Werte vom Geburtsort der Mutter ($p=0,001$; niedrigere Werte, siehe auch Abbildung 8c), vom Faktor Region Ilseburg ($p=0,002$) und von der BCG-Impfung ($p=0,011$). Diese drei Faktoren sind untereinander hochgradig korreliert; kausal würde als Erklärung ein Einfluß der BCG-Impfung auf die spätere Entwicklung der Immunglobuline Sinn machen. Hierfür gibt es jedoch keine Hinweise aus anderen Untersuchungen, und die deutlich stärkere Korrelation mit dem Faktor Geburtsort der Mutter läßt die Assoziation von IgG und BCG-Impfung eher als Folgezusammenhang erscheinen.

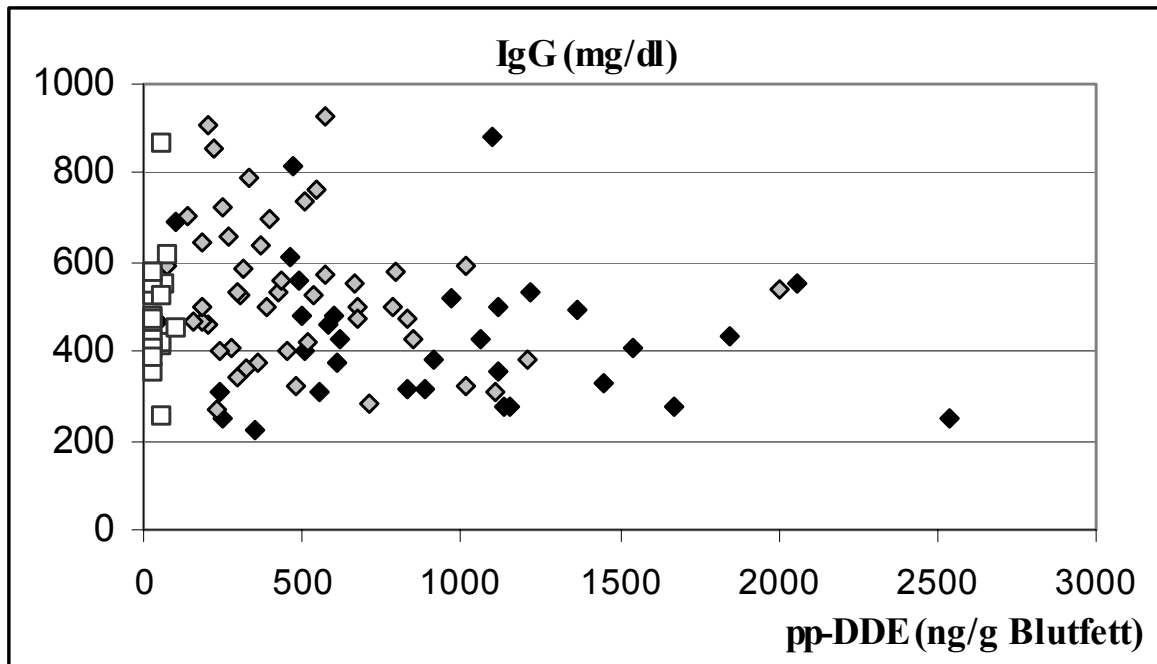


Abbildung 8.c: Streudiagramm von Immunglobulin G (IgG) und pp-DDE-Werten. Neben den gestillten Kindern (dunkle und graue Rauten) sind als zusätzliche Information auch die bei den statistischen Analysen nicht berücksichtigten nicht gestillten Kinder dargestellt (helle Quadrate, bei Kindern ohne POP-Einzelanalyse wurden die pp-DDE-Werte der Pool-Analyse verwendet). Die gestillten Kinder sind zusätzlich unterteilt nach Geburtsort der Mutter: DDR (schwarz) und alte BRD (grau).

Überraschend war auch, daß viele andere gemessene Parameter der klinischen Chemie mit den IgG-Werten korrelierten (Spearman-Analyse, $n=101$, in Klammern angegeben Korrelationskoeffizient und p-Wert): Albumin (-0,206; $p=0,039$, als einziger dieser Parameter ebenfalls signifikant mit pp-DDE assoziiert, s.o.), Prealbumin (-0,261; $p=0,008$), Eisen (-0,275; $p=0,005$), Totalbilirubin (-0,199; $p=0,046$), ALT (0,209; $p=0,036$), TBG (0,291; $p=0,003$), Vitamin E (-0,226; $p=0,023$), Vitamin A (-0,219; $p=0,028$), β -Carotin (-0,262; $p=0,008$). Bei der hohen Zahl mit IgG assoziierter Parameter ist ein zufälliger Zusammenhang auszuschließen. Erklärungen von der Physiologie her ergeben sich jedoch nicht unmittelbar. Es blieb daher unklar, inwieweit die IgG-Werte selbst diese Parameter direkt oder indirekt beeinflussen, inwieweit die Zusammenhänge jeweils Folge des Einflusses eines unbekannten dritten Faktor sind, oder inwieweit die IgG-Werte durch einen der gemessenen Parameter direkt oder indirekt beeinflusst werden. Nur im letzten Fall wäre eine Berücksichtigung in einem multivariaten Modell gerechtfertigt. Da die kausalen Zusammenhänge nicht geklärt werden konnten, wurden die genannten biologischen Parameter nicht bei den multivariaten Analysen berücksichtigt.

Nachdem die Residuenanalyse keinen Hinweis auf eventuelle Ausreißer bzw. Zweifel an der Modellstruktur liefert, wurden alle 80 gestillten Kinder in ein lineares Modell einbezogen (mit log. naturalis von IgG- und pp-DDE-Werten als beste Normalverteilungs-Anpassung). Ohne Eingabe weiterer Faktoren betrug der p-Wert 0,013 (erklärte Varianz 7,6%); er änderte sich bereits leicht bei Einbeziehung der möglichen Confounder "Infektzeichen bei der Blutentnahme" und "Zahl der bisherigen Infekte" (pp-DDE-Einfluß $p=0,032$, erklärte Varianz

13,6%). Bei Hinzunahme des Faktors "Mutter in der DDR geboren" hatte pp-DDE keinen signifikanten Einfluß mehr ($p=0,182$, erklärte Varianz 18,6%). Dies war zunächst nicht verwunderlich, da dieser Faktor hochgradig mit den pp-DDE-Werten assoziiert war (2,24-fach höhere Werte, siehe 7.1.) und die Signifikanz aufgeteilt wurde. Jedoch hatte in diesem Modell der Faktor "Mutter in der DDR geboren" einen wesentlich höheren Einfluß ($p=0,035$), so daß nicht auszuschließen war, daß ein pp-DDE-Effekt durch einen unbekannten Faktor vorgetäuscht wurde, der mit dem Faktor "Mutter in der DDR geboren" assoziiert war (z.B. andere Ernährungsgewohnheiten). Ähnliches gilt bei Einbeziehung der Faktoren "Region Ilseburg" und "BCG-Impfung".

Es wurde daher eine Gruppen-Aufteilung vorgenommen (Mutter in der DDR geboren: ja $n=33$, nein $n=47$) und die Modelle getrennt gerechnet unter jeweils der Einbeziehung der möglichen Confounder "Infektzeichen bei der Blutentnahme" und "Zahl der bisherigen Infekte". Dabei ergab sich in der Subgruppe "ja" für pp-DDE ein p von 0,803 (erklärte Varianz 23,3%, bedingt durch die starke Assoziation mit der Zahl der bisherigen Infekte), in der Subgruppe "nein" ein p von 0,281 (erklärte Varianz nur 9,3%). Somit ließ sich bei dieser Betrachtung kein signifikanter Effekt von pp-DDE auf IgG nachweisen.

Insgesamt kann ein negativer Effekt von pp-DDE auf die Entwicklung der IgG-Werte nicht ganz ausgeschlossen werden; sollte er existieren, so ist er sicherlich gering und erklärt nur einen kleinen Teil der relativ großen Varianz der IgG-Werte. Wahrscheinlicher ist jedoch, daß die Abhängigkeit zwischen pp-DDE und IgG letztlich auf einen Ursachenkomplex "Mutter in der DDR geboren" zurückzuführen ist, in dem der kausale Faktor nicht genauer differenziert werden konnte.

Wie in Kapitel 6.2.5. dargestellt, waren die spezifischen Impf-Antikörpertiter stark von der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit abhängig. Eine einfache Spearman Korrelations-Analyse von Titer und POP-Verbindung machte daher keinen Sinn. Daher wurden in das unter 6.2.5. beschriebene lineare Modell zusätzlich zur seit der letzten Impfung vergangenen Zeit und zur Anzahl der bis zur Untersuchung gegebenen Impfungen die Werte der 6 POP-Verbindungen/-Verbindungsgruppen jeweils einzeln eingegeben. Für Tetanus-IgG berechneten sich standardisierte β -Werte von 0,007 (I-TEq, $p=0,930$), -0,060 (WHO-TEQ, $p=0,472$), -0,133 (Summe PCBs 138,153,180, $p=0,105$), -0,037 (pp-DDE, $p=0,654$), 0,017 (β -HCH, $p=0,843$) und 0,030 (HCB, $p=0,714$). Für HiB-Antikörper waren die entsprechenden β -Werte -0,034 (I-TEq, $p=0,710$), -0,092 (WHO-TEQ, $p=0,317$), -0,145 (Summe PCBs 138,153,180, $p=0,114$), -0,060 (pp-DDE, $p=0,515$), 0,012 (β -HCH, $p=0,896$) und -0,022 (HCB, $p=0,813$). Somit ließ sich kein signifikanter Einfluß der Konzentrationen von POP-Verbindungen auf die Bildung von Impf-Antikörpern nachweisen.

8.2.4 Zelluläres Immunsystem

Wie aus Tabelle 8b zu ersehen ist, konnten für Parameter des weißen und roten Blutbildes keine signifikanten Assoziationen mit Konzentrationen von POP-Verbindungen beobachtet werden. Ausnahme war die signifikant positive Assoziation von Monozyten-Zahl pro Volumeneinheit ($p=0,036$) und Summe der PCBs 138,153,180. Bei multivariater Betrachtung in einem linearen Modell mit den möglichen Einflußfaktoren Infektzeichen und Unruhe bei der Blutentnahme sowie sCrP blieb der statistische PCB-Einfluß auf ähnlichem Niveau ($\beta=0,231$, $p=0,032$), bei zunehmend geringer werdendem Einfluß von Unruhe ($\beta=0,187$, $p=0,015$), Infektzeichen ($\beta=0,266$, $p=0,092$) und sCrP ($\beta=0,079$, $p=0,473$). Die Varianzaufklärung des Modells betrug 17,1 %. Somit kann ein geringer, die Zellzahl erhöhender Effekt der PCB-Hauptverbindungen auf die Monozyten nicht ausgeschlossen werden. In der bereits erwähnten Arbeit von WEISGLAS-KUPERUS et al. (1995) war bei Kindern im Alter von 3 Monaten über eine negative Assoziation von Monozytenzahl und Dioxin/PCB-Exposition (prä- und postnatal) berichtet worden. Insgesamt erscheint eine zufällige Assoziation als am wahrscheinlichsten.

Bei den Lymphozyten-Subpopulationen konnten keine signifikanten Assoziationen mit POP-Werten beobachtet werden (Tabelle 8b), bis auf eine signifikant negative Assoziation von

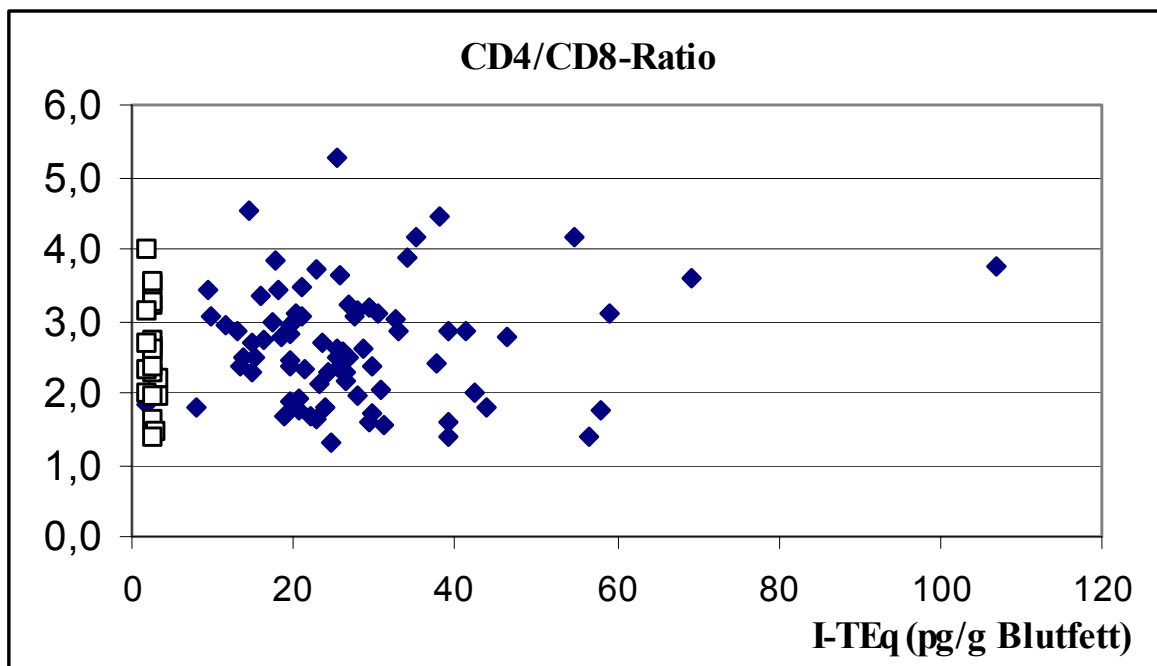


Abbildung 8.d: Streudiagramm von CD4/CD8-Ratio und I-TEq-Werten. Neben den gestillten Kindern (dunkle Symbole) sind als zusätzliche Information auch die bei den statistischen Analysen nicht berücksichtigten nicht gestillten Kinder dargestellt (helle Symbole, bei Kindern ohne POP-Einzelanalyse wurden die I-TEq-Werte der Pool-Analyse verwendet).

CD21-positiven B-Zellen (Reifungsmarker). Dieser Parameter gehört jedoch zu den sehr schlecht reproduzierbaren (Tabelle 6a), die Korrelation ist daher sehr wahrscheinlich zufällig bedingt (es wurde keine multivariate Analyse vorgenommen). Der prozentuale Anteil der B-Zellen an den Lymphozyten war nicht auffällig mit den pp-DDE-Konzentrationen assoziiert, sodaß sich keine zusätzlichen Interpretationsmöglichkeiten für die negative Assoziation mit den IgG-Werten ergaben. Für die berichtete signifikant negative Assoziation von Prozentsatz der B-Zellen und DDT-Konzentration in der Muttermilch (NAGAYAMA et al., 1998c) ergab sich aus der vorliegenden Untersuchung keine Bestätigung (Spearman Korrelations-Koeffizient -0,036, $p=0,749$).

Auch für die CD4/CD8-Ratio wurde entgegen den (widersprüchlichen) Publikationen anderer Autoren (DEWAILLY et al., 1993; NAGAYAMA et al., 1998a) keine signifikante Assoziation mit POP-Verbindungen gefunden. Zur Illustration ist exemplarisch die Korrelation der CD4/CD8-Ratio mit den I-TEq-Werten in Abbildung 8d dargestellt.

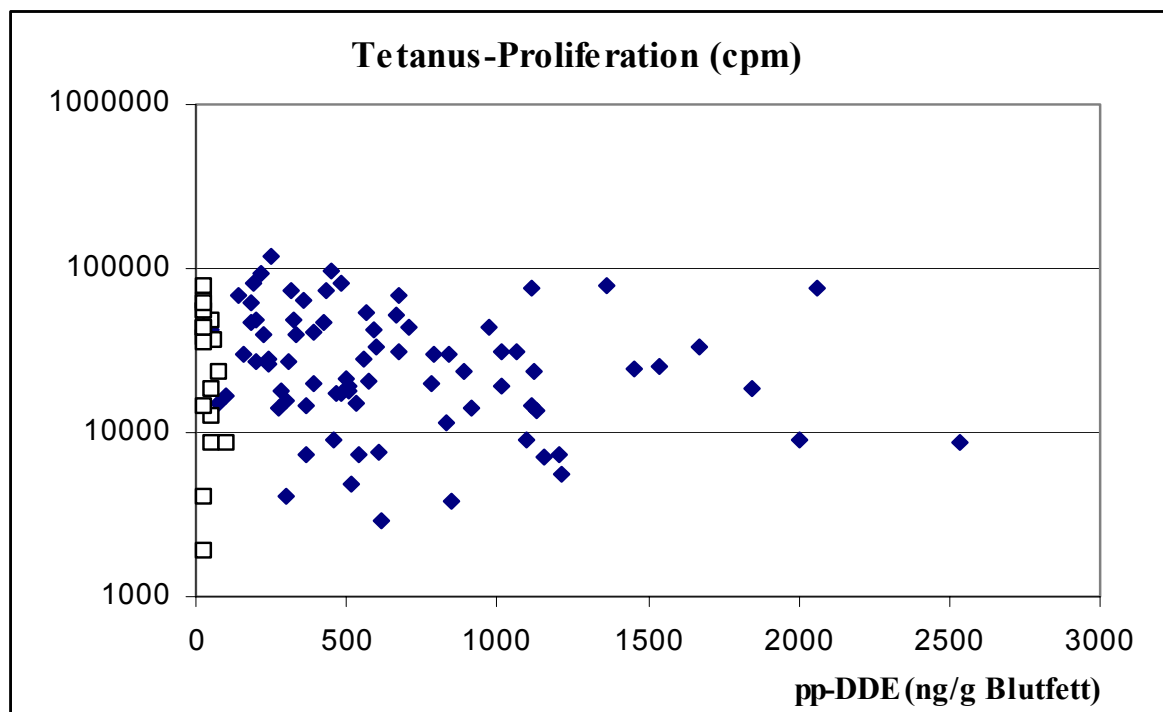


Abbildung 8.e: Streudiagramm von Tetanus-Proliferation in counts per minute (cpm) und pp-DDE-Werten. Neben den gestillten Kindern (dunkle Symbole) sind als zusätzliche Information auch die bei den statistischen Analysen nicht berücksichtigten nicht gestillten Kinder dargestellt (helle Symbole, bei Kindern ohne POP-Einzelanalyse wurden die pp-DDE-Werte der Pool-Analyse verwendet).

Bei den funktionellen Untersuchungen des lymphozytären Immunsystems zeigte sich keine signifikante Assoziation der Zytokin-Produktion von isolierten Lymphozyten/Monozyten (PBMCs) nach 2-tägiger PHA-Stimulation mit den POP-Werten (allerdings war nur Interleukin-5 relativ gut reproduzierbar: Tabelle 6a). Gleiches gilt für die Lymphozyten-Proliferation nach Mitogen- und Antigen-Stimulation, bis auf eine signifikant geringere Proliferation nach Tetanus-Stimulation (in cpm/well, maximaler Wert der mit drei Tetanus-Konzentrationen gemessenen Proliferation) in Abhängigkeit von der pp-DDE-Konzentration (Spearman Korrelations-Koeffizient -0,257, $p=0,022$).

Graphisch ist der Zusammenhang für die Tetanus-Stimulation als Streudiagramm in Abbildung 8e dargestellt (inklusive der nicht gestillten Kinder, die bei den statistischen Auswertung nicht berücksichtigt wurden). Bei der Betrachtung in einem linearen Modell mit den jeweils logarithmierten Werten betrug der p-Wert ohne Berücksichtigung weiterer Faktoren 0,05. Als im Modell sinnvollerweise zu berücksichtigende weitere Parameter wurden die Anzahl der Tetanus-Impfungen (auch wenn im Gruppenunterschied keine signifikante Differenz zwischen 2x und 3x geimpften Kindern nachweisbar war: siehe 6.2.5.) und die Zahl der eingesetzten Lymphozyten (es bestand bei der Tetanus-Proliferation eine mit der Zahl der Lymphozyten ansteigende Tendenz, die jedoch nicht proportional war; daher erschien die Auswertung als cpm/Lymphozyt nicht sinnvoll) gewählt. Hierbei blieb der statistisch signifikante Einfluß von pp-DDE bestehen: bei einer relativ geringen Varianzaufklärung von 13,0 % ergaben sich standardisierte β -Werte für pp-DDE von -0,262 ($p=0,018$), für die Anzahl der Tetanus-Impfungen von 0,236 ($p=0,037$) und für die Lymphozytenzahl von 0,199 ($p=0,078$). Anders als bei der multivariaten Auswertung der IgG-Werte (siehe 8.2.3.) ergab die zusätzliche Aufnahme des Parameters "Mutter in der DDR geboren" keinen signifikanten Einfluß ($p=0,357$), gleiches gilt für die zusätzliche Aufnahme von der seit der letzten Impfung vergangenen Zeit ($p=0,970$), der fortlaufenden Untersuchungsnummer ($p=0,351$, d.h. ausreichende Methodenstabilität im Untersuchungszeitraum) und der zwischen der Blutentnahme und dem Eintreffen im Labor vergangenen Zeit ($p=0,446$; wie nach den Voruntersuchungen zu erwarten, gab es somit keine wesentliche Einschränkung der Lymphozyten-Proliferationsfähigkeit innerhalb der Transportzeit von maximal 4 Stunden). Die Betrachtung der nicht gestillten Kinder in Abbildung 8e zeigt, daß sich die relativ große Varianz der Lymphozyten-Proliferation nach Tetanus-Stimulation auch in dieser Gruppe wiederfindet.

Die funktionelle Untersuchung der Granulozyten (Chemilumineszenz, ausgewertet in maximal erreichten emittierten Lichteinheiten pro Zeit nach Zymosan-Opsonierung mit Probanden-Plasma) zeigte eine signifikant negative Assoziation mit den β -HCH-Werten. Graphisch ist der Zusammenhang als Streudiagramm in Abbildung 8f dargestellt (inklusive der nicht gestillten Kinder, die bei den statistischen Auswertungen nicht berücksichtigt wurden). Zu bedenken ist, daß von allen bei der Auswertung berücksichtigten POPs auch die β -HCH-Werte der gestillten Kinder relativ nah an der Nachweisgrenze von ca. 20 ng/g Blutfett lagen. Für eine multivariate Analyse ließen sich keine sinnvollerweise zu betrachtenden Einflußfaktoren ermitteln, auch die fortlaufende Untersuchungsnummer (Methodenstabilität im Untersuchungszeitraum ?) und die zwischen der Blutentnahme und dem Eintreffen im Labor vergangenen Zeit (Abnahme der Granulozyten-Funktionsfähigkeit innerhalb der Transportzeit von maximal 4 Stunden ?) hatten keinen erwähnenswerten

Einfluß auf die Chemilumineszenz. Bei Einbeziehung der nicht gestillten Kinder war die Assoziation nicht mehr signifikant (Spearman Korrelations-Koeffizient -0,139, $p=0,173$; für Kinder ohne Einzelanalyse wurde der Wert der Pool-Analyse berücksichtigt). Die biologische Reproduzierbarkeit dieses Parameters wurde bis auf wenige Ausnahmen nicht geprüft, da die Benutzung des am Charité-Standort Berlin-Mitte aufgestellten Meßgerätes einen sehr hohen Zeitaufwand mit sich brachte.

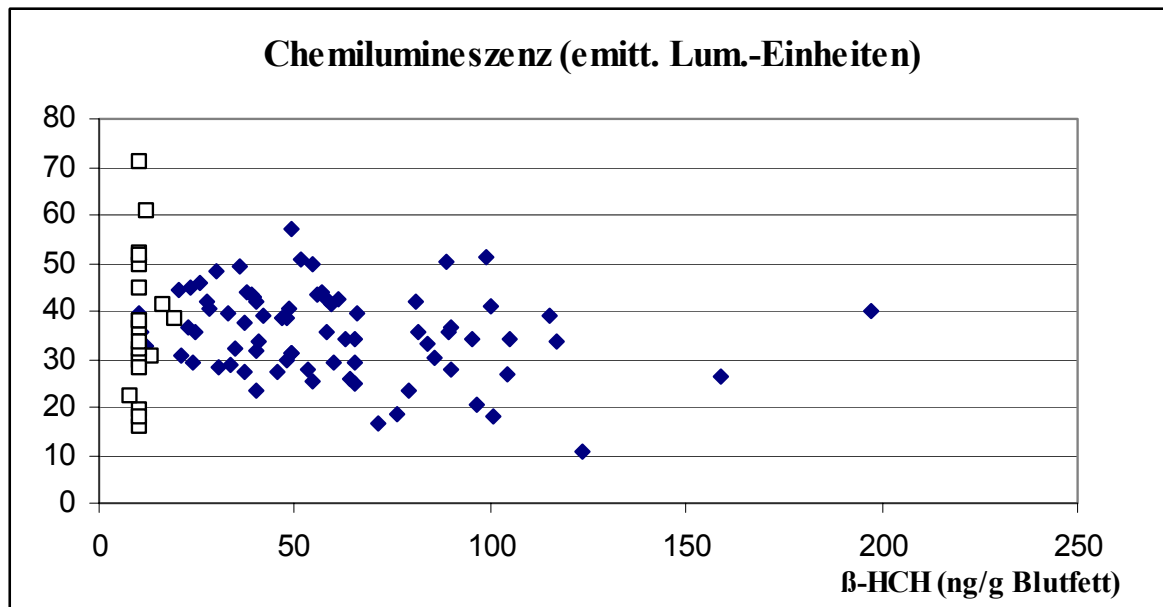


Abbildung 8.f: Streudiagramm von Chemilumineszenz in emittierten Lichteinheiten pro Zeit und β -HCH-Werten. Neben den gestillten Kindern (dunkle Symbole) sind als zusätzliche Information die bei den statistischen Analysen nicht berücksichtigten nicht gestillten Kinder dargestellt (helle Symbole, bei Kindern ohne POP-Einzelanalyse wurden die halbe Nachweisgrenze der Pool-Analyse verwendet).

9. Abschließende Diskussion und Bewertung

9.1 Studienkonzept und dessen Umsetzung

Die Umsetzung des Studienkonzeptes gelang ohne wesentlichen Probleme. Durch die problemlose Rekrutierung und die Bereitschaft des Projektträgers, weitere finanzielle Mittel zur Verfügung zu stellen, konnten die Zahl der Studienkinder (80 gestillte Kinder) gegenüber den ursprünglichen Planungen deutlich erhöht werden und so die Untersuchungen auf eine breitere statistische Basis gestellt werden.

Ein wesentlicher Teil des Konzeptes war die Rekrutierung von überdurchschnittlich hoch exponierten Kindern. Dies gelang z.T. durch die Untersuchung der Ilsenburger Kinder, deren PCDD/PCDF-Werte jedoch nur bei relativ wenigen tatsächlich deutlich über denen der Berliner Kinder lagen. Dies war durch zwei Umstände bedingt: relativ viele Mütter aus Ilseburg hatten gar keine überdurchschnittlichen PCDD/PCDF-Werte (z.T. weil sie nicht lange in der Region gelebt hatten, z.T. aus ungeklärten Gründen), und die Kinder aus Ilseburg waren im Mittel weniger lange gestillt worden. Wie die Studienergebnisse zeigten (s.u.), wird der Akkumulations-Effekt während der Stillperiode erst ab einer Vollstilldauer von 6 Monaten besonders deutlich. Daher hatten viele in Berlin besonders lange gestillte Kinder POP-Werte, die über den ursprünglichen Erwartungen lagen. Bei Betrachtung der Höhe der absoluten Werte ist zu bedenken, daß die bei der Auswertung benutzten, auf nach Formel (aus Cholesterin und Triglyceriden) berechnetes Gesamtfett bezogenen POP-Konzentrationen niedriger sind als diejenigen, die auf extrahiertes Fett bezogen wurden. Hier besteht weiterer Klärungsbedarf.

Teil des Studienkonzeptes war zudem die Erfassung eines möglichst großen Konzentrationsbereiches, in dem möglicherweise durch POPs bedingte Veränderungen biologischer Marker auftreten können. Der niedrige Konzentrationsbereich wurde durch Einbeziehung von Kindern erfaßt, deren ältere Geschwister ebenfalls lange gestillt wurden. Hierbei zeigte sich als nicht lösbare Bias-Problematik für die immunologischen Untersuchungen, daß diese Kinder im Vergleich zu den Einzelkindern mehr Infekte durchgemacht hatten, was auch Einfluß auf die Immunglobulin-G-Bildung hatte. Eine ähnliche Problematik (größerer POP-Konzentrationsbereich nur mit anderen Nachteilen zu erkaufen) ergab sich aus der unterschiedlichen früheren Staatszugehörigkeit der Mütter (im Westen höhere PCB-Werte, im Osten höhere pp-DDE-Werte). Durch multivariate statistische Analysen konnten diese Faktoren bei der Auswertung berücksichtigt werden (s.u.).

9.2 Gemessene biologische Parameter

Durch Optimierung verschiedener Methoden und technische Fortschritte war es möglich, aus den entnommenen 15 ml Blut eine große Zahl von biologischen Parametern zu messen. Dies erschien angesichts der oft sehr emotional geführten Dioxin-Diskussion sinnvoll, um bei negativem Ergebnis dem Einwand zu entgehen, bestimmte Parameter seien ja gar nicht erfaßt worden. Da es um einen eventuellen POP-Einfluß auf innerhalb des Normalbereichs liegende

biologische Parameter ging, waren an die Methoden besondere qualitative Ansprüche zu stellen, insbesondere an deren zeitliche Stabilität. Bis auf wenige Ausnahmen konnten diese gewährleistet werden.

Wertvolle zusätzliche Informationen für die Interpretation konnten durch die initial nicht geplanten Wiederholungs-Untersuchungen von 36 Kindern gewonnen werden, bei denen die biologische Variation der gemessenen Parameter innerhalb weniger Wochen beurteilt werden konnte.

9.3 POP-Kinetik während des Stillens

Durch die parallele Untersuchung der POP-Konzentrationen bei Mutter und Kind konnte erstmals bei einer größeren Gruppe die Akkumulation der Verbindungen während der Stillperiode erfaßt werden. Dies war nicht nur für die meßtechnisch aufwendigsten Dioxine, Furane und coplanaren PCBs möglich, sondern auch für weitere relevante POP-Verbindungen. Der theoretisch erwartete, von der Stilldauer abhängige Akkumulations-Effekt ließ sich eindrucksvoll bestätigen. Überraschend waren jedoch zwei Ergebnisse:

- Bei einer Vollstilldauer von bis zu 4 Monaten ist die Akkumulation weniger ausgeprägt als theoretisch erwartet (bei keiner POP-Verbindung 11 Monate nach der Geburt im Durchschnitt höhere Konzentrationen beim Kind im Vergleich zur Mutter). Ein Modell zur Anpassung an die tatsächlich gefundenen Konzentrations-Quotienten (Kind/Mutter) befindet sich noch in Arbeit (Ergebnisse werden nachgereicht).
- Aus eigenen Untersuchungen und denen anderer Arbeitsgruppen war eine geringere Akkumulation der hochchlorierten Verbindungen zu erwarten (geringerer Transfer in die Muttermilch, schlechtere Resorption). Tatsächlich fanden sich für diese Verbindungen die geringsten Konzentrations-Quotienten (Kind/Mutter). Innerhalb der Gruppe der weniger hoch chlorierten Verbindungen war ein weitgehend gleiches kinetisches Verhalten anzunehmen, das dem einer lipophilen Modellsubstanz entsprechen sollte (100% Transfer in die Muttermilch, 100% Resorption). Tatsächlich fanden sich aber relativ deutliche Differenzen, mit höchsten Werten für β -HCH. Die Ursache hierfür blieb unklar.

9.4 POP-Wirkungen auf biologische Parameter ?

Die Frage möglicherweise auftretender Effekte auf biologische Parameter als Folge der POP-Exposition wurde zunächst durch bivariate Korrelationsanalysen (Spearman) untersucht (Tabelle 8a und 8b). Bei den 93 Parametern, bei denen die statistischen Prüfungen jeweils für 6 POP-Verbindungen/Verbindungsgruppen vorgenommenen wurden, fanden sich insgesamt 25 signifikante Assoziationen ($p < 0,05\%$). Diese Zahl lag grob im Rahmen der Erwartungen, die sich allein aufgrund des Zufalls bei unabhängigen Parametern ergeben hätte.

Bei der multivariaten Analyse der beobachteten signifikanten Assoziationen zeigte sich in vielen Fällen, daß bei Einbeziehung weiterer Faktoren keine Signifikanz mehr hinsichtlich der betrachteten POPs bestand. Ein schönes Beispiel für mögliche Fehlinterpretationen bei Nicht-Berücksichtigung von Confoundern ist die mit der POP-Belastung sinkende Zahl von

Infektionen (signifikant für β -HCH). Dieser Scheineffekt entsteht durch das Vorhandensein von meist ebenfalls lange gestillten Geschwistern, die ein höheres Infektionsrisiko für Luftwegsinfekte bei gleichzeitig durchschnittlich niedrigerer POP-Exposition bedeuten. Nach multivariater Prüfung blieben nur noch für wenige biologische Parameter signifikante Assoziationen mit POP-Verbindungen/Verbindungsgruppen bestehen: Höhere T_4 -Werte in Assoziation mit I-TEq-, β -HCH- und HCB-Werten, höhere Monozyten-Zahlen in Assoziation mit der Summe der Konzentrationen von PCB 138, 153 und 180 (beides entgegen möglichen Erwartungen aus Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen), niedrigere Lymphozyten-Proliferation nach Tetanus-Stimulation in Assoziation mit der pp-DDE-Konzentration und niedrigere Chemilumineszenz in Assoziation mit der β -HCH-Konzentration.

Insgesamt lassen sich die durchgeführten statistischen Prüfungen folgendermaßen zusammenfassen und interpretieren:

- Nach multivariater Prüfung wiesen nur wenige Parameter eine leicht signifikante Assoziation mit einzelnen POP-Werten auf, die maximal eine Varianzaufklärung von wenigen Prozent entsprach.
- Die Punktverteilung im Streudiagramm spricht gegen einen echten Effekt (beobachtete Unter- bzw. Obergrenzen verteilen sich auf den ganzen Konzentrationsbereich).
- Die biologischen Parameter mit signifikanten Assoziationen wurden bisher nicht in anderen Untersuchungen als in gleicher Richtung durch POPs beeinflussbar beschrieben (z.T. wurde ein gegenteiliger Effekt berichtet). Zusammen mit den ersten beiden Punkten ist daher die Wahrscheinlichkeit hoch, daß diese Assoziationen durch Zufall bedingt sind.
- Aus grundsätzlichen Erwägungen sind Ergebnissen epidemiologischer Studien bei negativen Resultaten einfacher zu bewerten ist als bei positiven, bei denen die Frage von Zufall und nicht berücksichtigten Confoundern im Raum steht, solange nicht die Bestätigung durch weitere Untersuchungen erfolgt. In diesem Zusammenhang ist der Nicht-Bestätigung von publizierten Effekten auf das Immun- und Hormonsystem im Hintergrundbereich ein hoher Wert zuzumessen.

Vor dem Hintergrund der nachgewiesenen positiven Effekte des Stillens fällt daher die Entscheidung leicht, die bestehende Stillempfehlung zu bekräftigen. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund der in Deutschland weiter absinkenden POP-Konzentrationen in der Muttermilch. Wie in dieser Empfehlung vorgesehen, sollte aus ernährungsphysiologischen Gründen nach 6 Monaten mit der Einführung von Beikost begonnen werden.

Trotz dieses Statements bleibt jedoch zu bedenken:

- Bei den POPs handelt es sich um Umweltsubstanzen, die im menschlichen Organismus im günstigsten Fall nur ohne Nutzen sind (abhängig von Substanz und Konzentration).
- Wenn auch ein Auftreten von Langzeiteffekten infolge der relativ hohen Exposition in den ersten Lebensmonaten im zu betrachtenden Konzentrationsbereich unwahrscheinlich ist, wären solche schwer zu erfassen, falls sie denn tatsächlich vorliegen sollten. Entsprechende Untersuchungen wären nur mit enorm hohem Zeit- und Kostenaufwand realisierbar und stießen an prinzipielle Grenzen: geht es doch nicht nur um eine Vielzahl von

Einzelsubstanzen, die teilweise noch nicht einmal quantitativ meßbar sind, sondern auch um mögliche Kombinationseffekte. Eine Risiko-Bewertung ist auch unter dem Aspekt weitgehend fehlender Daten hinsichtlich der POP-Kinetik bis zum Erwachsenen-Alter schwierig (eine Nachuntersuchung ausgewählter Kinder in den nächsten Jahren könnte diese Erkenntnis-Lücke schließen).

- Unter diesem Aspekt und unter dem der pränatalen PCB-Exposition, die in einigen Studien mit schlechteren entwicklungsneurologischen Testergebnissen assoziiert gefunden wurde, sollten die POP-Konzentrationen in der Biosphäre durch Fortführung der eingeleiteten Umweltschutz-Maßnahmen (insbesondere Emissionsvermeidung) weiter abgesenkt werden.

- Da die gesellschaftlich zur Verfügung stehenden Mittel hierfür begrenzt sind, sollte bei der politischen Entscheidung über die Verwendung von solchen Mitteln jedoch auch andere mögliche Umweltrisiken einbezogen werden. Als Beispiel für die Kinderheilkunde sei hier das Schwermetall Blei genannt, das als Umweltgift höhere Relevanz hinsichtlich meßbarer Effekte hat als die z.Zt. im öffentlichen Bewußtsein stärker als Bedrohung wahrgenommenen Dioxine. Auch in dieser Studie konnte in einer Familie eine relevante Blei-Belastung mit eindeutiger Auswirkung auf biologische Parameter nachwiesen werden.

10. Literatur

- ABRAHAM K, KROWKE R, NEUBERT D (1988) Pharmacokinetics and biological activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: 1. Dose-dependent tissue distribution and induction of hepatic ethoxyresorufin O-deethylase in rats following a single injection. *Arch Toxicol* **62**: 359-368
- ABRAHAM K, KNOLL A, ENDE M, PÄPKE O, HELGE H (1996) Intake, fecal excretion, and body burden of polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans in breast-fed and formula-fed infants. *Pediatr Res* **40**: 671 – 679
- ABRAHAM K, PÄPKE O, GROSS A, KORDONOURI O, WIEGAND S, WAHN U, HELGE H (1998a) Time course of PCDD/PCDF/PCB concentrations in breast-feeding mothers and their infants. *Chemosphere* **37**:1731-1741
- ABRAHAM K, PALAVINSKAS R, WAHN U, HELGE H, MATHAR W (1998b) Still relatively high PCDD/PCDF concentrations in human milk of mothers living in a contaminated area in Germany. *Organohalogen Compounds* **38**: 33-36
- ABRAHAM K, GEUSAU A, BROCKMÖLLER J, FRÖTSCHL R, BRÖSICKE H, WAHN U, STINGL G, HELGE H (1999) Biomarkers in three subjects from Vienna highly exposed to 2378-TCDD: CYP induction and immune function. *Organohalogen Compounds* **44**: 47-50
- ALALUUSUA S, LUKINMAA PL, VARTIAINEN T, PARTANEN M, TORPPA J, TUOMISTO J (1996) Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans via mother's milk may cause developmental defects in the child's teeth. *Environ Toxicol Pharmacol* **1**:193-197
- ALALUUSUA S, LUKINMAA PL, TORPPA J, TUOMISTO J, VARTIAINEN T (1999) Developing teeth as biomarker of dioxin exposure. *Lancet* **353**:206
- ALDER L, BECK H, MATHAR W, PALAVINSKAS R (1994) PCDDs, PCDFs, PCBs, and other organochlorine Compounds in human milk – levels and their dynamics in Germany. *Organohalogen Compounds* **21**:39-44
- DEWAILLY E, BRUNEAU S, LALIBERTE C, BELLES-ILES M, WEBER JP, AYOTTE P, ROY R (1993) Breast milk contamination by PCBs and PCDDs/PCDFs in arctic Quebec: preliminary results on the immune status of Inuit infants. *Organohalogen Compounds* **13**:403 – 406
- ERNST M, FLESCH-JANYS D, MORGENSTERN I, MANZ A (1998) Immune cell functions in industrial workers after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: dissociation of antigen-specific T-cell responses in cultures of diluted blood and of isolated peripheral blood mononuclear cells. *Environ Health Perspect* **106** (Suppl 2): 701-705

- FAHRMEIR L, HAMERLE A, TUTZ G (1996) Multivariate statistische Verfahren. Walter de Gruyter & Co, Berlin, 1996
- GABAY C, KUSHNER I (1999) Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med* **340**: 448-454
- GRÜTERS A, KRUSCHE S, BECK H, BRÖSICKE H, HELGE H (1992) Nicht-invasive Messung der Monooxygenaseaktivität und Dioxinkonzentrationen in der Muttermilch bei gestillten und ungestillten Säuglingen. In: *Kinderarzt und Umwelt, Jahrbuch 1991/92*. Editor: KE von Mühlendahl. pp 130-134
- JAHANSEN HR, ALEXANDER J, ROSSLAND OJ, PLANTING S, LOVIK M, GAARDER PI, GDYNIA W, BJERVE KS, BECHER G (1996) PCDDs, PCDFs, and PCBs in human blood in relation to consumption of crabs from a contaminated fjord area in Norway. *Environ. Health Perspect.* **104**: 756 – 764
- JUNG D, BERG PA, EDLER L, EHRENTAL W, FENNER D, FLESCH-JANYS D, HUBER C, KLEIN R, KOITKA C, LUCIER G, MANZ A, MUTTRAY A, NEEDHAM L, PÄPKE O, PIETSCH M, PORTIER C, PATTERSON D, PRELLWITZ W, ROSE DM, THEWS A, KONIETZKO J (1998) Immunologic findings in workers formerly exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its congeners. *Environ Health Perspect* **106 (Suppl 2)**: 689-695.
- KOOPMAN-ESSEBOOM C, MORSE DC, WEISGLAS-KUPERUS N, LUTKESCHIPHOLT IJ, VAN DER PAAUW CG, TUINSTRA LGMT, BROUWER A, SAUER PJJ (1994) Effects of dioxins and polychlorinated biphenyls on thyroid hormone status of pregnant woman and their infants. *Pediatr Res* **36**:468-473
- KODAMA H, OTA H (1980) Transfer of polychlorinated biphenyls to infants from their mothers. *Arch Environ Health* **35**:95-100
- KRÜGER N, NEUBERT B, HELGE H, NEUBERT D (1990) Induction of Caffeine-demethylations by 2,3,7,8-TCDD in marmoset monkeys measured with a ¹⁴CO₂ breath-test. *Chemosphere* **20**:1173-1176
- LANDI MT, GRASSMAN J, MASTEN S, BELL D, CONSONNI D, MOCARELLI P, NEEDHAM L, LUCIER G, BERTAZZI PA, CAPORASO N (1999) Molecular epidemiology of dioxin-related effects in Seveso. *Organohalogen Compounds* **44**:371-374
- LAMBERT GH, HSU CC, GUO L, RYAN JJ, SCHOELER DA (1994) The dose response relationship between the serum levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and cytochrome P4501A2 activity as determined by the caffeine breath test. *Organohalogen Compounds* **21**:485-488
- LÜ YC, WU YC (1985) Clinical findings and immunological abnormalities in Yu-Cheng patients. *Environ Health Perspect* **59**: 17-29

- MOCARELLI P, NEEDHAM LL, MAROCCHI A, PATTERSON DG, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, MEAZZA L, CARRERI V (1991a) Serum concentrations of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and test results from selected residents of Seveso, Italy. *J Toxicol Environ Health* **32**: 357-366.
- MOCARELLI P, MOROCCHI A, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, COLOMBO L, MONDONICO A, MEAZZA L (1991b) Effects of dioxin exposure in humans at Seveso, Italy. Banbury Report 35: Biological basis for risk assessment of dioxins and related compounds, Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp 98-110.
- MOCARELLI P, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, PATERSON DG, NEEDHAM LL (1996) Change in sex ratio with exposure to dioxin. *Lancet* **348**: 409.
- NAGAYAMA J, TSUJI H, IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, OKAMURA K, HASEGAWA M, SATO K, MA HY, YANAGAWA T, IGARASHI H, FUKUSHIGE J, WATANABE T (1998a) Postnatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on lymphocyte subsets in Japanese breast-fed infants. *Chemosphere* **37**: 1781-1787
- NAGAYAMA J, TSUJI H, IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, OKAMURA K, HASEGAWA M, SATO K, TOMITA A, YANAGAWA T, IGARASHI H, FUKUSHIGE J, WATANABE T (1998b) Perinatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on lymphocyte subpopulations in Japanese breast-fed infants. *Organohalogen Compounds* **37**: 151-155
- NAGAYAMA J, TSUJI H, NAKAGAWA R, IIDA T, OKAMURA K, HASEGAWA M, SATO K, TOMITA A, YANAGAWA T, IGARASHI H, FUKUSHIGE J, WATANABE T (1998c) Perinatal exposure to organochlorine pesticides on lymphocyte subpopulations in Japanese breast-fed infants. *Organohalogen Compounds* **37**: 157-161
- NAGAYAMA J, OKAMURA K, IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, TSUJI H, HASEGAWA M, SATO K, MA HY, YANAGAWA T, IGARASHI H, FUKUSHIGE J, WATANABE Z (1998d) Postnatal exposure to chlorinated dioxins and related chemicals on thyroid hormone status in Japanese breast-fed babies. *Chemosphere* **37**: 1789-1793
- NAGAYAMA J, TSUJI H, OKAMURA K, NAKAGAWA R, IIDA T, HIRAKAWA H, MATSUEDA T, HASEGAWA M, SATO K, TOMITA A, YANAGAWA T, IGARASHI H, FUKUSHIGE J, WATANABE T (1998e) Perinatal exposure to polychlorinated biphenyls on lymphocyte subpopulations and thyroid hormone status in Japanese breast-fed infants. *Organohalogen Compounds* **37**: 163-167
- NATO (1988) Pilot study on international information exchange on dioxins and related compounds. International equivalency factors (I-TEF) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. NATO Report No. **176**: 1-26
- NEUBERT D (1988) Significance of pharmacokinetic variables in reproductive and developmental toxicity. *Xenobiotica* **18**, Suppl 1:45-58

- NEUBERT D (1998) Reflections on the assessment of the toxicity of "dioxins" for humans, using data from experimental and epidemiological studies. *Teratog Carcinog Mutagen* **17**, 157-215.
- NEUBERT R, JACOB-MÜLLER U, STAHLMANN R, HELGE H, NEUBERT D (1990) Polyhalogenated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the immune system. 1. Effects on peripheral lymphocyte subpopulations of a non-human primate (*Callithrix jacchus*) after treatment with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). *Arch Toxicol* **64**: 345-359
- NEUBERT R, MASKOW L, WEBB J, JACOB-MÜLLER U, NOGUEIRA AC, DELGADO I, HELGE H, NEUBERT D (1993) Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. *Life Sciences* **53**:1995-2006
- NEUBERT R, MASKOW L, WEBB J, DELGADO I, HELGE H, NEUBERT D (1995) Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 2. In vitro proliferation of lymphocytes from workers with quantified moderately-increased body burdens. *Life Sciences* **56**:421-436
- ONICA D, TORSSANDER J, WALDENLIND L (1992) Recurrent transient hyperphosphatasemia of infancy in an adult. *Clin Chem* **38**: 1913-1915
- OTT MG, ZOBEL A, GERMANN C (1994) Laboratory results for selected target organs in 138 individuals occupationally exposed to TCDD. *Chemosphere* **29**: 2423-2437.
- PATANDIN S, WEISGLAS-KUPERUS N, DE RIDDER MAJ, KOOPMAN-ESSEBOOM C, VAN STAVEREN WA, VAN DER PAAUW CG, SAUER PJJ (1997) Plasma polychlorinated biphenyl levels in Dutch preschool children either breast-fed or formula-fed during infancy. *Am J Public Health* **87**: 1711-1714
- PÄPKE O (1997) Determination of PCDD/Fs in human blood – a fast and sensitive method. *Organohalogen Compounds* **31**: 212 – 214
- PÄPKE O (1998) Humanproben. In: *Handbuch Dioxine*, Oehme M (Hrsg) Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, pp. 267-334
- PHILLIPS DL, PIRKLE JL, BURSE VW, BERNERT JT, HENDERSON LO, NEEDHAM LL (1989) Chlorinated hydrocarbon levels in human serum: effects of fasting and feeding. *Arch Environ Contam Toxicol* **18**: 495-500
- ROGAN WJ, GLADEN BC, GUO YLL, HSU CC (1999) Sex ratio after exposure to dioxin-like chemicals in Taiwan. *Lancet* **353**: 206-207.
- SCHMITT M, GRÜTERS A, BECK H, REMY N, BÜTTNER P, ELLENBOHN P, HELGE H, WAHN U (1992) Does passive smoking lead to a decrease of CD4+Lymphocytes in infants? *Allergy* **47**: 17

- STEIN P, ROSALSKI SB, FOO AY, HJELM M (1987) Transient Hyperphosphatasemia of infancy and early childhood: clinical and biochemical features of 21 cases and literature review. *Clin Chem* **33**: 313-318
- SVENSSON BG, HALLBERG T, NILSSON A, SCHÜTZ A, HAGMAR L (1994) Parameters of immunological competence in subjects with high consumption of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Int Arch Occup Environ Health* **65**: 351-358
- TONN T, ESSER C, SCHNEIDER EM, W STEINMANN-STEINER-HALDENSTÄTT, GLEICHMANN E (1996) Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ Health Perspect* **104**: 422-426
- VAN DEN BERG M UND 23 WEITERE AUTOREN (1998) Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect* **106**: 775-792.
- WANNER R, ZOBEL A, ABRAHAM K, KLEFFE J, HENZ BM, WITTIG B (1999) Polymorphism at codon 554 of the human Ah receptor: different allelic frequencies in Caucasians and Japanese and no correlation with severity of TCDD induced chloracne in chemical workers. *Pharmacogenetics* **9**: 777-780
- WINKER N, TUSCHL H, KOVAC R, WEBER W (1996) Immunological investigations in a group of workers exposed to various levels of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J Appl Toxicol* **17**: 23-29.
- WEISGLAS-KUPERUS N, SAS TCJ, KOOPMAN-ESSEBOOM C, VAN DER ZWAN CW, DE RIDDER MAJ, BEISHUIZEN A, HOOIJKAAS H, SAUER PJJ (1995) Immunologic effects of background prenatal and postnatal exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls in dutch infants. *Pediatr Res* **38**:404-410
- WUTHE J, HAGENMAIER H, PÄPKE O, KETTMANN C, FROMMBERGER R, LILLICH W (1992) Dioxin and furan (PCDD/PCDF) levels in human blood and human milk of people living in a PCDD/PCDF contaminated area. *Chemosphere* **25**: 1135-1140.

11. Danksagung

Das Projekt war nur durchführbar, weil viele Personen direkt oder indirekt bei der Verwirklichung geholfen haben. Ihnen bin ich zu großem Dank verpflichtet. Ganz oben auf der Liste stehen

Anja, Antonia D., Antonia R., Antonia Sch., Antonie, Benjamin, Cecilia, Charleen, Christine, Clara, Clara-Marie, Dana, Daniel, David, Enrico, Elisabeth, Felix, Fenja, Flora, Frederik, Frida, Hannes, Hanno, Hauke, Hendrik, Henrike, Isa, Jan-Torben, Janne, Jaqueline H., Jaqueline L., Jennifer, Jeffrey, Jeremy, Joana, Johanna, Johannes, Jonas S., Jonas St., Jonay, Julia, Julius, Jupp, Kai, Katja, Laurenz, Lea, Lena, Lisa H., Lisa Sch., Leon Sch., Leon Sp., Louis, Luisa H., Luisa Sch., Malina, Mandy, Manuel, Marcel, Maribel, Marie, Marielle, Marius, Markus L., Markus Sch., Marthe, Maurice, Max, Merten, Milan, Nele, Nicolai, Niklas, Nastassja, Nicolas, Nils, Olivia, Pascal, Paul Bl., Paul Br., Paula, Paulina, Pauline H., Pauline T., Philip, Raya, Ricarda, Robert, Ruben, Sarah, Sebastian, Sophia, Sophie, Stephan, Steven, Talea, Timo, Tom, Valentin, Wilhelm und Xaver

sowie deren Eltern, die sich bereit erklärt haben, an der Studie teilzunehmen. Ein besonderer Dank geht an Jaqueline und Mira, die sich für die Untersuchungen der ^{13}C -CO₂-Basisexhalation zur Verfügung gestellt haben.

Bei der Identifikation von höher PCDD/PCDF-exponierten Müttern haben durch Muttermilch-Analysen einen wichtigen Beitrag zu dieser Studie geleistet: Herr Dr. Mathar (BgVV), Herr Dr. Malisch (Chemische Landesuntersuchungsanstalt Freiburg) sowie Frau Dr. Knoll, Frau Dr. Brunsweller und Herr Dr. Ende (Lebensmitteluntersuchungsamt Oldenburg). Vielen Dank hierfür.

Bei der Rekrutierung von Studienkindern in Berlin haben geholfen: Frau Prof. Przyrembel (Nationale Stillkommission, BgVV), Frau Bamberg (Stillgruppe des Bezirksamtes Charlottenburg), die Station 37 des Virchow-Klinikums (Wochenbett-Station der Geburtshilflichen Abteilung, Direktor Prof. Dr. Dudenhausen), sowie die Kinderarztpraxen von Frau Dr. Rugo, Herrn Dr. Karsten und Herrn Dr. Lindner. In Ilsenburg und Umgebung haben bei der Rekrutierung geholfen: Die Kinderarztpraxen von Frau Dr. May, Frau Dr. Schmidt, Frau Dr. Grunewald und Herrn Dr. Beese, die Hebammen Frau Hammer-Buritz und Frau Niemann sowie das Einwohnermeldeamt der Stadt Ilsenburg. Ihnen allen möchte ich herzlich danken.

Für die Labor-Untersuchungen möchte ich zunächst den MTAs unserer Abteilung (Klinik für Pädiatrische Pneumologie und Immunologie, Direktor Prof. Dr. Wahn), Frau Oberreit und Frau Ellensohn, für ihre engagierte und zuverlässige Arbeit danken, ohne die diese Studie nicht durchführbar gewesen wäre. Bedanken möchte ich mich auch bei den MTAs des Instituts für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie (Direktor Prof. Dr. Köttgen), von denen ich stellvertretend Frau Frisicke und Frau Moritz nennen möchte. Dem Leiter dieses Labors, Herrn Dr. Müller, sowie den Kollegen Herrn Dr. Bernd, Herrn PD Dr. Renz, Herrn

Dr. Herz und Dr. Karge danke ich für Unterstützung und Anregung. Für die Zell-Differenzierung der Ausstrichpräparate danke ich Frau Löffke (Labor Prof. Dr. Henze), für die Durchführung der AP-Isoenzym-Differenzierung Frau Laiacker (Labor Prof. Dr. Becker), für die ¹³C-Messung der Atemtestproben Frau Pfundstein und Herrn Dr. Brösicke (Labor Prof. Dr. Becker), und für die Bestimmung der Jod-Konzentrationen im Urin Frau Dr. Stach und Prof. Dr. Willgerodt (Universitätskinderklinik Leipzig).

Ferner möchte ich den Firmen The Binding Site (Tetanus- und HiB-Antikörper, IgG-Subklassen), Orion Diagnostica (löslicher Transferrin-Rezeptor) und Cibaron (Diphtherie-Toxoid) für das außerordentliche Entgegenkommen bei der Überlassung von Test-Kits bzw. Toxoid danken.

Frau Bauerfeind und Prof. Dr. Meister (TFH Berlin) gebührt der Dank für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung.

Zum Schluß gilt mein besonderer Dank dem Projektrat des Forschungszentrums Karlsruhe (insbesondere Herrn Dr. Friebe, Herrn Dr. Horsch und Herrn Dr. Krug, sowie für die jahrelange Unterstützung und Beratung Herrn Dr. Wuthe) und dem Land Baden-Württemberg, das durch die Bereitstellung der Mittel aus dem "Projekt Umwelt und Gesundheit" diese Untersuchung erst möglich gemacht hat.

Zuallerletzt gilt mein Dank meinen beiden Chefs: Prof. Dr. Wahn, der mich in allen Angelegenheiten immer großzügig unterstützt hat, und Prof. emeritus Dr. Helge, der seit über 10 Jahren in Bezug auf die Dioxin-Untersuchungen bei Kindern mein wichtigster Diskussionspartner ist und auch bei der Planung und Auswertung dieser Studie einen wesentlichen Beitrag geleistet hat.

12. Zusammenfassung

Die Akkumulation von POPs (Persistent Organic Pollutants) in der Nahrungskette und die infolgedessen auftretende relativ hohe Exposition gestillter Säuglinge hat zu Besorgnissen hinsichtlich möglicher negativer Folgen für die Gesundheit dieser Kinder geführt. In dem Projekt wurde die Frage untersucht, ob die POP-Belastung der Muttermilch in der Bundesrepublik Deutschland zu meßbaren Veränderungen sensibler biologischer Parameter bei lange gestillten Kindern führt. Gleichzeitig sollte die Akkumulation dieser Verbindungen beim Kind in Abhängigkeit von der Stilldauer genauer untersucht werden.

Das Studienkonzept sah die Untersuchung von mindestens 4 Monate lang voll gestillten Kindern im Alter von 11 Monaten mit Blutentnahme für ein umfangreiches Untersuchungsprogramm (insbesondere klinische Chemie, Immunologie, Schilddrüsenfunktion) vor. Zur Erfassung der Exposition sollten PCDDs, PCDFs, PCBs und andere CKWs sowie die Schwermetalle direkt im Blut gemessen werden (parallel bei Mutter und Kind). Zusätzlich sollte auch eine kleine Gruppe von nicht gestillten Kindern untersucht werden.

Entsprechend den strengen Auswahlkriterien wurden zwischen Juni 1997 und Mai 1999 insgesamt 101 gesunde Kinder untersucht. 21 von ihnen waren nicht gestillt worden (= weniger als 2 Wochen gestillt). Von den 80 lange gestillten Kindern kamen 27 aus der Region Ilseburg/Harz (z.T. mit höherer PCDD/PCDF-Exposition durch die dort bis 1990 betriebene Kupferhütte). Die durchschnittliche äquivalente Vollstilldauer der gestillten Kinder betrug 7,4 Monate.

Das Untersuchungsprogramm konnte ohne wesentliche Probleme umgesetzt werden. Bei 36 Kindern wurde zudem eine 2. Blutentnahme zur Kontrolle einzelner auffälliger Werte durchgeführt (durchschnittlich 4 Wochen nach der ersten Blutentnahme), bei der die biologischen Parameter noch einmal gemessen wurden. Hierdurch konnten für einjährige Kinder Daten über die biologische Variation dieser Parameter innerhalb eines kurzen Zeitraums gewonnen werden, die für die Interpretation möglicher Effekte wichtig sind.

Insgesamt wurden 175 POP-Analysen aus 3-5 ml kindlichem Plasma (Mütter 10 ml) nach einer speziell für diese Studie von der ERGO Forschungsgesellschaft entwickelten Methode durchgeführt. Bei den gestillten Kindern waren 12 PCDD/Fs, 7 PCBs (126, 169, 118, 156, 138, 153, 180) sowie β -HCH, HCB und pp-DDE meßbar. Für die Dioxin-Toxizitätsäquivalente (I-TEq) lagen die Werte bei den nicht gestillten Kindern durchschnittlich bei 2,4 pg/g Blutfett, bei den gestillten Kindern bei 25,3 pg/g Blutfett (Maximum 107 pg/g Blutfett). Diese Werte wurden auf (nach Formel aus Cholesterin und Triglyceriden berechnetes) Gesamtfett bezogen und liegen niedriger als Werte, die bei Bezug auf nach der Extraktion gewogenes Fett ermittelt wurden. Zur Klärung dieser Diskrepanz sind weitere Untersuchungen erforderlich.

Durch die parallele Untersuchung der POP-Konzentrationen bei Mutter und Kind konnte erstmals bei einer größeren Gruppe die Akkumulation der Verbindungen während der Stillperiode erfaßt werden. Der theoretisch erwartete, von der Stilldauer abhängige Akkumulations-Effekt ließ sich eindrucksvoll bestätigen. Der Quotienten der POP-

Konzentrationen von Kind und Mutter 11 Monate nach der Geburt zeigte eine lineare Abhängigkeit der logarithmierten Werte von der äquivalenten Vollstilldauer mit bemerkenswert hoher Korrelation. Allgemein war die Akkumulation niedrig chlorierter Verbindungen stärker als die der höher chlorierten. Bei einer Vollstilldauer von 4 Monaten ist die Akkumulation weniger ausgeprägt als theoretisch erwartet (bei keiner POP-Verbindung 11 Monate nach der Geburt im Durchschnitt höhere Konzentrationen beim Kind im Vergleich zur Mutter). Ein Modell zur Anpassung an die tatsächlich gefundenen Konzentrations-Quotienten (Kind/Mutter) befindet sich noch in Arbeit (Ergebnisse werden nachgereicht).

Die Frage möglicherweise auftretender Effekte auf biologische Parameter als Folge der POP-Exposition wurde zunächst durch bivariate Korrelationsanalysen (Spearman) untersucht. Bei den 93 Parametern, bei denen die statistischen Prüfungen jeweils für 6 POP-Verbindungen/Verbindungsgruppen vorgenommenen wurden, fanden sich insgesamt 25 signifikante Assoziationen ($p < 0,05\%$). Diese Zahl lag grob im Rahmen der Erwartungen, die sich allein aufgrund des Zufalls bei unabhängigen Parametern ergeben hätte. Bei der multivariaten Analyse der beobachteten signifikanten Assoziationen zeigte sich in vielen Fällen, daß bei Einbeziehung weiterer Faktoren keine Signifikanz mehr hinsichtlich der betrachteten POPs bestand. Nach multivariater Prüfung blieben nur noch für wenige biologische Parameter signifikante Assoziationen mit POP-Verbindungen/Verbindungsgruppen bestehen, die am ehesten zufällig bedingt sind. Ein Einfluß von Dioxinen auf Parameter wie Thyroid-stimulierendes Hormon (TSH) oder die Lymphozyten-CD4/CD8-Ratio, wie z.T. von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, konnte nicht bestätigt werden.

Vor dem Hintergrund der nachgewiesenen positiven Effekte des Stillens fällt daher die Entscheidung leicht, die bestehende Stillempfehlung zu bekräftigen. Dies gilt insbesondere vor dem Hintergrund der in Deutschland weiter absinkenden POP-Konzentrationen in der Muttermilch. Wie in dieser Empfehlung vorgesehen, sollte aus ernährungsphysiologischen Gründen nach 6 Monaten mit der Einführung von Beikost begonnen werden.

Abschlußbericht des Projektes

Veränderungen biologischer Parameter (Immunsystem, Cytochrom P450-System) bei 3 hoch 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD)-exponierten Personen aus Wien (BWB 20002)

Dr. Klaus Abraham

**Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Pneumologie und
Immunologie, Charité, Humboldt-Universität Berlin,
Augustenburger Platz 1, 13 353 Berlin**

Dezember 2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	3
2. Hintergründe, Studienziele und Studienkonzept	6
2.1. Immunsystem	6
2.2. Cytochrom P450-Induktion der Leber (CYP1A2)	7
3. Untersuchte Personen	9
3.1. TCDD-exponierten Personen aus Wien	9
3.2. Kontroll-Kollektiv	9
4. Untersuchungsmethoden	11
4.1. Immunsystem	11
4.2. Cytochrom P450-Aktivität der Leber (CYP1A2)	12
5. Ergebnisse	15
5.1. Immunsystem	15
5.2. Cytochrom P450-Aktivität der Leber (CYP1A2)	29
6. Diskussion	38
6.1. Immunsystem	38
6.2. Cytochrom P450-Aktivität der Leber (CYP1A2)	41
7. Literatur	45
8. Verwendete Abkürzungen	50
9. Danksagung	51
10. Zusammenfassung	52

1. Einleitung

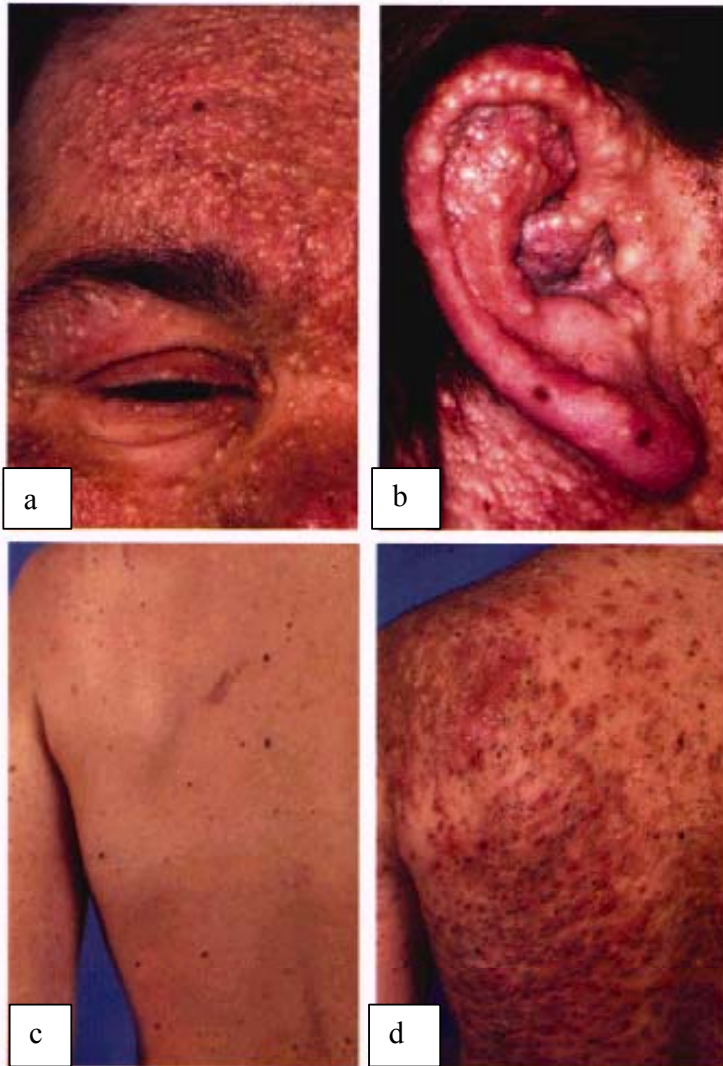
Ende 1997 entwickelten 2 Mitarbeiterinnen (Person 1 und 2) eines Wiener Textil-Forschungsinstituts Zeichen von Akne. Aufgrund des schweren Verlaufs und der untypischen Verteilung bei Person 1 wurde im Frühjahr 1998 an der Immundermatologischen Abteilung der Universität Wien (Leiter: Prof. Dr. G. Stingl) die Verdachtsdiagnose 'Chlorakne' gestellt, die durch eine Blutuntersuchung bestätigt wurde: mit 144.000 (Person 1) und 26.000 (Person 2) pg 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) pro g Blutfett (ppt) wurden die höchsten jemals bei Erwachsenen gemessenen Konzentrationen ermittelt (Vergleich Seveso: höchste gemessene Konzentration bei Erwachsenen: 10.400 ppt, bei Kindern: 56.000 ppt). Andere Dioxin- oder Furan-Kongenere wurden nicht vermehrt gefunden, bis auf eine leichte Erhöhung von 1,2,3,7,8-Pentachlordibenzo-p-dioxin. Dieses Verteilungsmuster ist typisch bei einer Bildung aus 2,4,5-Trichlorphenol, was als Quelle vermutet wird. Die genauen Umstände der Entstehung und insbesondere der Exposition der beiden erwähnten Personen, die im gleichen Zimmer an Computer-Arbeitsplätzen tätig waren, konnten nicht geklärt werden; ein krimineller Hintergrund ist nicht ausgeschlossen. Blutuntersuchungen aller 30 Beschäftigten zeigten bei 3 weiteren Mitarbeitern mit 856 ppt (Person 3), 159 ppt und 98 ppt TCDD über dem Hintergrundbereich von ca. 1 ppt liegende TCDD-Werte.

Person 1 ist klinisch von der Chlorakne sehr schwer betroffen. In den ersten 2 Jahren seit Auftreten der Symptome kam es zu einer kontinuierlichen Verschlechterung und Ausbreitung der Hautsymptome, die sich auch durch übliche medikamentöse Maßnahmen der Akne-Behandlung (systemische und lokale Anwendung von Retinoiden) nicht aufhalten ließen (Abbildung 1 a-d). Seitdem ist durch regelmäßige Inzisionen der Zysten die Intensität insgesamt allmählich rückläufig (Ausbrennen des Krankheitsprozesses durch Zerstörung der Talgdrüsen), jedoch tritt auch weiterhin Chlorakne an bisher nicht oder nur wenig betroffenen Hautpartien neu bzw. verstärkt auf. Die durch den Krankheitsprozeß ausgelöste Hautentzündung macht eine antiinflammatorische Behandlung (incl. oralen Kortikosteroiden und Antibiotika) erforderlich, zudem benötigt die Patientin eine Schmerz- und antidepressive Therapie (GEUSAU et al., 2000, 2001).

Die bei Person 2 auf die typische Lokalisation (Gesicht, prä- und retroaurikuläre Region) beschränkte Chlorakne wurde lokal mit Tretinoin behandelt und ist inzwischen abgeklungen bis auf kaum erkennbare residuale Hautveränderungen (Abbildung 1 e-f, GEUSAU et al., 2001). Bei Person 3 traten keine klinischen Symptome auf.

Die extrem hohen TCDD-Konzentrationen, die bei Person 1 und 2 einer Dosis von ca. 25 bzw. 6 µg/kg Körpergewicht entsprechen (initial lagen die Werte vermutlich noch höher), machen bereits deutlich, daß der Mensch sicher nicht zu den sehr TCDD-empfindlichen Spezies gehört (LD₅₀ für Meerschweinchen ca. 1 µg/kg Körpergewicht). Seit Bekanntwerden der Intoxikation wurden insbesondere die Personen 1 und 2 umfangreich und wiederholt hinsichtlich möglicher weiterer Organmanifestationen untersucht. Bis auf eine sekundäre Amenorrhoe bei Person 1 fanden sich keine weiteren klinischen Auffälligkeiten (GEUSAU et al., 2001). Es bestätigte sich dabei die bereits nach dem Seveso-Unfall 1976 gewonnene Erkenntnis, daß der Mensch für

Person 1



Person 2

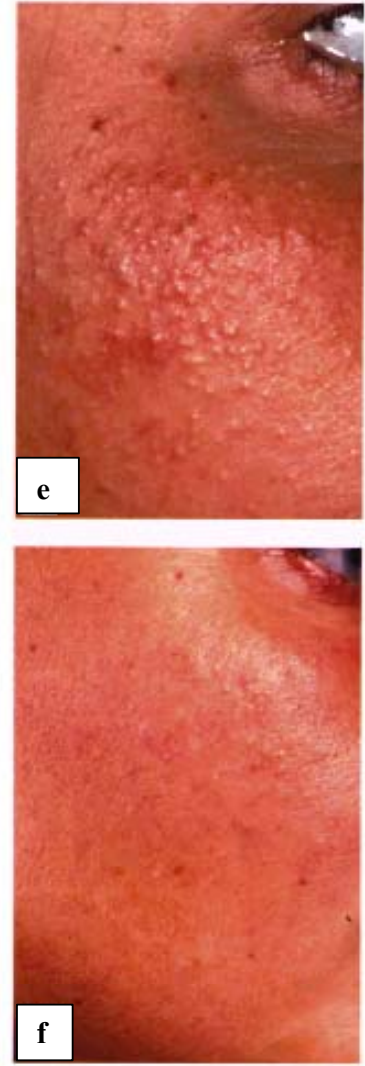


Abbildung 1: Klinisches Bild der Chlorakne in Person 1 (a-d) und 2 (e-f).

Person 1: a) multiple Zysten im Gesichtsbereich und b) im aurikulären Bereich, der bei der gewöhnlichen Akne üblicherweise nicht betroffen ist (beide Aufnahmen ca. ein Jahr nach Diagnosestellung); Rücken c) mit wenigen Zysten im Sommer 1998 und d) ein Jahr später, bedeckt mit zahlreichen schwer entzündeten Zysten.

Person 2: e) multiple geschlossene und offene Komedone in der malaren Region bei Diagnosestellung und f) nach einjähriger Behandlung mit Tretinoin.

aus: GEUSAU et al., 2001

Hautveränderungen (Chlorakne) besonders sensibel ist (wenn auch mit hoher interindividueller Variabilität), weitere gravierende klinische Symptome jedoch sogar im Konzentrationsbereich von einigen tausend bis einigen zehntausend ppt nicht unbedingt zu erwarten sind. Ein umfangreiches klinisch-chemisches Untersuchungsprogramm, wie es heute an einer Universitätsklinik für die Routine zur Verfügung steht, erbrachte bei den Personen 1 und 2 keine grob auffälligen Werte, bis auf eine Erhöhung der Zahl weißer Blutzellen im peripheren Blut (Leukozytose, alle Zellreihen betreffend) bei Person 1. Bei ihr fanden sich zudem zeitweise und/oder nur geringfügig verändert ein niedriges Hämoglobin (um 10 g/dl), eine erhöhte γ -GT und AP (einmalig im April 1998 gemessen) sowie erhöhte Cholesterin- und Triglycerid-Werte, die teilweise durch die erforderliche Therapie zu erklären sind. Die endokrinologischen Untersuchungen erbrachten keine Auffälligkeiten, bis auf leicht erniedrigte Östrogen- und Progesteron-Spiegel sowie leicht erhöhte Prolaktin-Spiegel bei Person 1 (u.U. im Zusammenhang mit der bestehenden sekundären Amenorrhoe, möglicherweise ist Prolaktin aber auch durch die antidepressive Therapie mit Serotonin-Antagonisten erhöht). Bei Person 2 fand sich einmalig ein erhöhter TSH-Wert, eine Fehlbestimmung ist nicht auszuschließen (GEUSAU et al, 2001).

Über diese Messungen mit Routine-Methoden hinausgehend wurden im Rahmen des Projektes weitergehende Untersuchungen des Immunsystems sowie des Cytochrom-P450-Systems durchgeführt, die parallel an einer Gruppe von gesunden Kontrollpersonen unternommen wurden.

2. Hintergründe, Studienziele und Studienkonzept

2.1. Immunsystem

Die beiden von der Chlorakne betroffenen Personen 1 und 2 mit extrem hohen TCDD-Werten wurden seit Frühjahr 1998 auch hinsichtlich möglicher Veränderungen des Immunsystems untersucht, ohne daß außer den oben erwähnten auffällige Befunde erhoben wurden. Dies entspricht den z.B. in Seveso (1976 und folgenden Jahren) gemachten Erfahrungen beim Menschen, wobei damals die immunologischen Methoden noch weniger weit entwickelt waren. Dioxine werden dennoch häufig insbesondere aufgrund tierexperimenteller Untersuchungen als "immuntoxisch" bezeichnet. Hierzu ist jedoch anzumerken, daß zahlreiche publizierte Effekte auf das Immunsystem hinsichtlich des beobachteten Musters nicht konsistent sind (bis auf die Thymus-Involution, die als epithelialer Effekt anzusehen ist; entsprechend kommt es bei hoher Exposition während der Embryonal- und Fetalentwicklung zu immunologischen Problemen). Die Wirkungen scheinen vielmehr von der untersuchten Spezies (bzw. Tierstamm) und dem Applikationsregime abhängig zu sein, sowohl Immun-Suppression als auch -Aktivierung wurden beschrieben, und die von Einzelnen im Niedrigdosisbereich beschriebenen Effekte wurden häufig nicht von anderen Arbeitsgruppen bestätigt. Da es in den letzten 20 Jahren keine schwerwiegenden Unfälle mit Dioxin-Intoxikation von Menschen gegeben hat, liegen für die zwischenzeitlich entwickelten differenzierteren immunologischen Untersuchungsmethoden kaum Erkenntnisse bezüglich spezieller Dioxin-abhängiger Veränderungen des menschlichen Immunsystems vor. Mit solchen Methoden wurden in den letzten Jahren Kollektive ehemaliger Chemiewerker untersucht, ohne daß überzeugende und konsistente Befunde für eine TCDD-Wirkung auf das Immunsystem des Menschen erhoben werden konnten (z.B. ERNST et al., 1998; JUNG et al., 1998; NEUBERT et al., 1993, 1995, 2000; OTT et al., 1994; TONN et al., 1996). Hier ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Exposition lange zurückliegt und zahlreiche Confounder (Alter, Erkrankungen, Rauchen, Expositionsmuster) zu berücksichtigen sind, die eine Interpretation der Daten bei der begrenzten Fallzahl erschweren.

Da für ein mögliches toxisches Potential von TCDD hinsichtlich des Immunsystems von Erwachsenen von dosisabhängigen Wirkungen auszugehen ist, lag es nahe, die hoch TCDD-belasteten Personen aus Wien genauer immunologisch zu untersuchen. Dabei sollten differenziertere Methoden eingeschlossen werden, die erst in den letzten Jahren entwickelt wurden. Da hierfür überwiegend keine Referenzwerte vorliegen und teilweise Methodenabhängigkeit besteht, sollte parallel eine Kontrollgruppe untersucht werden. Dies bot sich auch insofern an, als die Personen 1, 2 und 3 in etwa das gleiche Alter haben (ca. 30 Jahre), sonst gesund sind und nicht rauchen, so daß es möglich war, die Untersuchungen an einem entsprechend ausgesuchten Kollektiv vorzunehmen. Die insbesondere für die Messung der Enzyminduktion in der Leber sinnvolle Einbeziehung von starken Rauchern ließ zudem Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von Zigarettenrauch auf das Immunsystem von Erwachsenen erwarten.

2.2. Cytochrom P450-Induktion der Leber (CYP1A2)

Der zweite Teil der Untersuchungen betrifft die Ah-Rezeptor-vermittelte Synthese (POELLINGER 2000) von Cytochrom P450 in der Leber. Tierexperimentell ist sie der sensitivste und bestuntersuchte Effekt von TCDD mit klarer Dosis-Wirkungs-Beziehung (bei direkter Untersuchung von Lebergewebe, z.B. mit Hilfe der Ethoxy-Resorufin-O-Deethylase, EROD) (ABRAHAM et al., 1988). Auch für den Menschen ist grundsätzlich mit einer entsprechenden Reaktion zu rechnen. Diese Fragestellung ist dabei nicht nur interessant unter dem Aspekt der Induktion mit möglicherweise relevanten Veränderungen des Stoffwechsels (inklusive Frage der Kanzerogenität), sondern auch von grundsätzlicher Bedeutung, wird doch ein Großteil der TCDD-Wirkungen im Säugetier mit Ah-Rezeptor-vermittelten Mechanismen in Verbindung gebracht. Daher könnten genauere Erkenntnisse über den Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve der Induktion von Cytochrom P450 in der Leber auch einen Beitrag zur Diskussion um die Toxizität von TCDD beim Menschen liefern.

Zur Messung der Induktion des hier relevanten CYP1A2 in der Leber stehen nur indirekte Methoden zur Verfügung, mit denen der Stoffwechsel von Testsubstanzen gemessen wird. Etabliert ist in diesem Fall der Einsatz von Koffein, dessen Abbau mit verschiedenen Methoden erfaßt werden kann; kontrovers wird diskutiert, welcher der Tests der verlässlichste ist (BUTLER et al., 1989; KOTAKE et al., 1982; ROST et al., 1992). Der Atemtest, der als Testsubstanz ein an der relevanten Position mit einem stabilen Isotop markiertes Koffein benutzt (N-3-methyl-¹³C-Koffein), hat theoretisch den Vorteil, daß das ausgeatmete ¹³CO₂ ausschließlich den für CYP1A2 spezifischen Metabolismus widerspiegelt. Da Koffein nach oraler Aufnahme fast vollständig resorbiert wird, reflektiert die AUC (total area under the plasma concentration time curve) die Gesamt-Clearance, die somit ebenfalls ein verlässliches Maß für die Metabolisierungs-Kapazität ist (RENNER et al., 1984). Häufig als solche benutzt werden auch Metaboliten-Ratios wie das Verhältnis von Paraxanthin (17X) zu Koffein (137X), die möglicherweise weniger spezifisch sind, da sie auch von anderen Stoffwechselschritten abhängig und nicht zwangsläufig linear mit der Enzym-Aktivität korreliert sind. Gleiches gilt für die häufig verwendeten Urin-Metaboliten-Ratios (UMR), die zudem von weiteren Faktoren beeinflusst werden können (aktive renale tubuläre Sekretion und Resorption, Plasma-Proteinbindung, Urinflußgeschwindigkeit, pH-Wert), und daher in ihrer Bedeutung als Maß der CYP1A2-Metabolisierungs-Kapazität kontrovers diskutiert werden (CAMPBELL et al., 1987; KALOW und TANG, 1991; TANG et al., 1994; ROSTAMI-HODJEGAN et al., 1996; KADLUBAR et al., 1996).

Obwohl zu erwarten ist, daß CYP1A2 in der Leber des Menschen induzierbar ist, konnte dies bisher in-vivo bei moderat TCDD-exponierten Personen nicht gezeigt werden. Für andere persistente organischen Verbindungen mit Affinität zum Ah-Rezeptor konnte bei hoch PCB/PCDF-Kontaminierten (Yu-Cheng, Taiwan 1979) eine Induktion mit dem Koffein-Atemtest gemessen werden (Details siehe Diskussion). Lange bekannt ist auch, daß Inhalation von Zigarettenrauch zur CYP1A2-Induktion führt (z.B. VESTISEN et al., 1992; Sinués et al., 1999).

Nachdem die Voruntersuchungen der hoch TCDD-exponierten Wienerinnen bereits eine CYP1A2-Induktion mit dem Koffein-Test gezeigt hatte, sollten im Rahmen des Projektes diese Untersuchungen wiederholt und parallel an einer Kontrollgruppe von Nichtrauchern und starken Rauchern mit den gleichen Methoden vorgenommen werden, um folgende Fragen zu beantworten:

- wie entwickelt sich die gemessene Induktion bei den hoch exponierten Frauen mit abfallenden TCDD-Konzentrationen (individuelle Dosis-Wirkungs-Kurve?, als Teil einer Langzeituntersuchung) ?
- inwieweit ist bereits bei Person 3 (TCDD-Konzentration initial 870 ppt) eine außerhalb des Normalbereichs liegende Induktion nachweisbar?
- welche der verschiedenen Methoden zur Messung des Koffein-Metabolismus ist am besten geeignet zur Erfassung der Induktion bei TCDD-Exposition?
- wie stark ist der TCDD-Effekt im Vergleich zu dem von Zigarettenrauch?

Eine weitere Fragestellung, deren Beantwortung sich aus dem Vergleich innerhalb der Rauchergruppe ergeben könnte, betrifft die Abhängigkeit der CYP-Induktion von der Benutzung eines Filters (bisher unbeantwortete Frage).

Wie bereits in Bezug auf die immunologischen Untersuchungen hervorgehoben, sollte die Interpretation der Daten trotz geringer Fallzahl dadurch erleichtert werden, daß es sich bei den exponierten Personen aus Wien um eine ausschließliche und gut dokumentierte Exposition gegenüber TCDD handelt, und diese Nichtraucher etwa gleichen Alters sind.

3. Untersuchte Personen

3.1. TCDD-exponierten Personen aus Wien

Die Untersuchungen in Wien fanden wie geplant in Zusammenarbeit mit Frau Dr. A. Geusau und Prof. Dr. G. Stingl (Abteilung für Immundermatologie der Universität Wien) im Oktober 2000 statt. Die Personen 1, 2 und 3, die Nichtraucher und österreichischer Abstammung sind, waren zu diesem Zeitpunkt 32,9, 29,5 bzw. 29,2 Jahre alt. Daten ihrer Körpermaße sind Tabelle 1 zu entnehmen. Nach der Blutentnahme wurden die Proben für die immunologischen Untersuchungen innerhalb von 3,5 Stunden in Berlin weiterverarbeitet.

Untersuchungen der hepatischen CYP1A2-Aktivität mit Hilfe des Koffein-Tests wurde erstmals im Dezember 1998 durchgeführt, mehr als ein Jahr nach dem vermutlichen Zeitpunkt der Intoxikation (Atemtest, nur bei Person 1 und 2, TCDD-Konzentrationen zu diesem Zeitpunkt: 65.100 bzw. 13.700 ppt). Die Untersuchungen wurden wiederholt mit zusätzlichen Serum- und Urin-Untersuchungen im März 1999 (bei den Personen 1, 2 und 3; bei TCDD-Konzentrationen von 72.500, 15.100 bzw. 730 ppt), März 2000 (bei Person 1 und 2; bei TCDD-Konzentrationen von 39.300 bzw. 10.500 ppt) und Oktober 2000 (bei den Personen 1, 2 und 3; bei TCDD-Konzentrationen von 30.300, 10.100 bzw. 420 ppt).

Zum letztgenanntem Zeitpunkt (parallele Untersuchung des Kontroll-Kollektives) benötigte Person 1 folgende medikamentöse Behandlung: Methylprednisolon (2 oder 4 mg täglich alternierend), Diclofenac (2 x 50 mg täglich), Paroxetin (1 x 20 mg täglich), Pantoprazol (1 x 40 mg täglich), orales Morphin (10 mg bei Bedarf, bis zu 6 mal täglich) und Supplementierung von fettlöslichen Vitaminen während der Olestra-Behandlung (künstliches, nicht resorbierbares, nicht verdaubares Fett, mit dem eine Steigerung der TCDD-Ausscheidung über den Stuhl erreicht werden kann: GEUSAU et al., 1999). Die Personen 2 und 3 nahmen zu diesem Zeitpunkt keine Medikamente ein.

Die letzten Impfungen erfolgen bei Person 1, 2 und 3 gegen Tetanus im Oktober 1999 (unter 5 oder 10 mg Methylprednisolon täglich alternierend), 1991 bzw. 1995. Bei allen 3 Personen war mehr als 10 Jahre lang keine Diphtherie-Auffrischimpfung durchgeführt worden. Person 1 und 2 erhielten 4 Wochen vor der Untersuchung im Rahmen dieses Projektes eine entsprechende Impfung (siehe 4.1.).

3.2. Kontroll-Kollektiv

Als altersentsprechendes Kontrollkollektiv wurden in Berlin 50 Personen rekrutiert, die die folgenden Auswahlkriterien erfüllen mußten: gesund (keine akuten oder chronischen Erkrankungen, insbesondere kein akuter Infekt in den letzten 2 Wochen), Body-Mass-Index zwischen 18 und 26 kg/m², Alter zwischen 25 und 36 Jahren, nicht mehr als nur gelegentlicher geringer Alkoholkonsum, keine medikamentöse Behandlung, Eltern deutscher Abstammung. Die Probanden mußten entweder Nichtraucher (n=30) sein (mindestens seit einem Jahr nicht

geraucht, maximal 2 Zigaretten pro Woche wurden akzeptiert), oder als starke Raucher (n=20) mindestens 20 Zigaretten pro Tag rauchen. In der letztgenannten Gruppe wurden Personen gesucht, die mit bzw. ohne Filter rauchen (je n=10). Für die jeweiligen Gruppen wurden Frauen und Männer im gleichen Verhältnis rekrutiert. Die Untersuchungen fanden zwischen August und November 2000 statt. Wesentliche Daten des Kontroll-Kollektivs sind Tabelle 1 zu entnehmen.

Alle untersuchten Personen gaben nach entsprechender Information schriftlich ihr Einverständnis ab. Die Studie hatte zuvor die Zustimmung der Ethikkommission der Charité erhalten.

Tabelle 1: Wesentliche Daten der TCDD-exponierten Personen 1,2 und 3, sowie die der Kontrollgruppe.

	TCDD-exponiert*			Kontrollgruppe**	
	Person 1	Person 2	Person 3	Nichtraucher (n=30)	Raucher (n=20)
Geschlecht	weibl.	weibl.	männl.	weibl.:männl. = 1:1	
Alter (Jahre)	32,9	29,5	29,2	30,1 ± 3,2 (25 – 36)	31,0 ± 4,1 (25 – 36)
Gewicht (kg)	65	57	85	66,2 ± 10,0 (48 – 85)	64,1 ± 8,8 (51 – 80)
Größe (m)	1,68	1,60	1,86	1,75 ± 0,09 (1,58 – 1,95)	1,72 ± 0,08 (1,56 – 1,86)
BMI (kg/m ²)	23,0	22,3	24,6	21,5 ± 2,0 (18,4 – 25,9)	21,7 ± 2,3 (18,0 – 25,1)
Zigaretten pro Tag	0	0	0	0	28,1 ± 8,5 (20 – 50)

* im Oktober 2000

** Daten als: Mittelwert ± Standardabweichung (Minimum – Maximum)

4. Untersuchungsmethoden

4.1. Immunsystem

Für die immunologischen Untersuchungen wurden morgens in nüchternem Zustand Heparin-Blut (27 ml), EDTA-Blut (3 ml) und Vollblut zur Serum-Gewinnung (5 ml) abgenommen und innerhalb von 3,5 Stunden zur weiteren Verarbeitung ins Labor gebracht. Weitgehend dem im Antrag beschriebenen Programm gemäß wurden die folgenden Untersuchungen durchgeführt:

- Blutbild (automatischer Counter mit Differenzierung der Leukozyten-Populationen: Cell dyn 3500, Abbott)
- Lymphozyten-Subpopulationen: u.a. T-Zellen (CD3, CD4, CD8, memory/naive Zellen, Aktivierungsmarker, Adhäsionsmoleküle), B-Zellen, Nk-Zellen und andere zytotoxische Zellen, aus je 25µl EDTA-Vollblut, 3-Fluoreszenzfarben-Technik mit monoklonalen Antikörpern (Becton Dickinson), nach Färbung (15 Minuten) Erythrozyten-Lyse (Ortho) und Waschen der Leukozyten, Messung mit Zell-Analyser (FACS, Becton Dickinson). Im einzelnen wurden neben 5 Kombinationen zur Kontrolle und Geräteeinstellung folgende 17 Kombinationen mit den Fluoreszenzfarben Percp, PE bzw. FITC verwendet: CD3/TCR $\gamma\delta$ /TCR $\alpha\beta$, CD3/CD56/CD16, CD4/CD25/CD8, CD4/CD26/CD8, CD4/CD8/CD3, CD4/CD8/CD62L, CD4/CD8/HLA-DR, CD4/CD49d/CD29, CD4/CD45R0/CD29, CD4/CD45R0/CD11a, CD4/CD45R0/CD45RA, CD8/CD45R0/CD45RA, CD8/CD56/CD11a, CD8/CD56/CD3, CD8/CD49d/CD29, CD19/CD21/CD23, CD19/CD8/CD3.
- Lymphozyten-Proliferation: ^3H -Thymidin-Einbau, Stimulation von Heparin-Vollblut oder Ficoll-separierten Zellen (PBMCs, gewonnen durch Dichte-Gradienten-Zentrifugation mit Lymphoprep) mit rekombinantem humanen Interleukin-2 (IL-2), Mitogenen (Phytohämagglutinin, PHA; Poke Weed Mitogen, PWM) und Antigenen (Tetanus- und Diphtherie-Toxoid, Candida und Staphylokokken-Enterotoxin B, SEB) in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle im Ergebnis-Teil, jeweils Triplets), mit AIM V (Gibco) als Kulturmedium in 96-Well-Rundbodenplatten (Vollblut: 12,5 µl pro Well; PBMCs: 200.000 Zellen pro well). Nach Kultur unter Standardbedingungen (37°C, 5% CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit) für 3 Tage (IL-2, Mitogene) und 5 Tage (Antigene) ^3H -Thymidin-Puls (1 µCi pro Well, Amersham, 5 Ci/mmol) für 6 Stunden und anschließendes Einfrieren. Ernten am nächsten Tag durch Überführen der Zellen auf Filterplättchen mit Szintillationsgel, Messung im β -Counter (Wallac) und Auswertung als "counts per minute" (cpm, für Mittelwert des Triplets) und als Stimations-Index (SI, Verhältnis aus cpm-Wert und jeweils mitgeführter Medium-Kontrolle).
- Zytokin-Sekretion (Interferon γ und IL-5 in Zellkultur-Überständen nach 1 und 3 Tagen) nach Stimulation von PBMCs (3×10^6 Zellen in 1 ml Kulturmedium) mit Mitogen (PHA, 10 µg/ml). Nach 1 und 3 Tagen Abnahme von Aliquots des Kultur-Überstandes und Einfrieren bei -80°C, Konzentrations-Bestimmungen der Zytokine am Ende der Untersuchungsphase mit ELISA-Technik (Pharmingen).

- intrazelluläre Zytokin-Produktion (Interferon γ , IL-2 und IL-4) nach 6-stündiger Mitogen-Stimulation (PDB, Ionomycin) von Vollblut und anschließender intrazellulärer Färbung der Zytokine mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern (Becton Dickinson) nach Permeabilisierung (Saponin) sowie Oberflächenfärbung (CD3, CD8); Messung mit Zell-Analyser (FACS, Becton Dickinson).
- Granulozyten-Funktion (Chemilumineszenz): nach Dichte-Gradienten-Separation aus Heparin-Blut (mit Percoll) Stimulation mit opsoniertem Zymosan (Bakterienwand-Bestandteile) bei 37°C, Messung der Reaktion im Luminometer (Lumionoskan RS 1.2-0) für 30 Minuten, Ergebnisse als maximal erreichte Lumineszenz-Einheiten und Zeit bis zum Erreichen dieses Maximums.
- aus eingefrorenem Serum am Ende der Untersuchungsphase: Immunglobuline IgA, IgM, IgG (Routine-Methode, nur bei den Wienern), IgG-Subklassen (The Binding Site, Heidelberg, nur bei den Wienern), IgE (Elisa-Technik, Firma Pharmacia) sowie Impf-Antikörper gegen Tetanus (Elisa-Kit, Firma The Binding Site) und Diphtherie (freundlicherweise von Prof. Bartmann, Kinderklinik Bonn, bestimmt).

Zusätzlich wurde die Reaktion (Lymphozyten-Proliferation, Antikörperbildung) 4 bis 6 Wochen nach Diphtherie-Impfung bei 14 Personen des Kontrollkollektivs untersucht, bei denen die diese Impfung bei der Erstuntersuchung länger als 10 Jahre nicht aufgefrischt worden war und die mit der Auffrischung sowie der erforderlichen zweiten Blutentnahme einverstanden waren. Verwendet wurde die gleiche Charge von Diphtherie-Adsorbat-Impfstoff Behring für Erwachsene (0,5 ml mit mindestens 2 I.E. Diphtherie-Toxoid). Bei den Personen 1 und 2 aus Wien, bei denen ebenfalls länger als 10 Jahre keine Auffrischung durchgeführt worden war, wurde die Diphtherie-Impfung im September 2000 vier Wochen vor der Blutentnahme durchgeführt (Person 1 unter 2 oder 4 mg Methylprednisolon täglich alternierend).

4.2. Cytochrom P450-Aktivität der Leber (CYP1A2)

Zur Messung der Cytochrom P450-Induktion in der Leber wurde der Metabolismus von Koffein mit verschiedenen Methoden untersucht. Die Probanden sollten möglichst am Vortag der Untersuchung keine Koffein-haltigen Getränke oder Snacks zu sich genommen haben (denjenigen, die auf ihre morgendliche Tasse Kaffee nicht verzichten konnten, wurde dies noch am Vortag der Untersuchung erlaubt). Koffein wurde als ^{13}C -markierte Substanz oral appliziert (3-N-methyl- ^{13}C -Koffein, bezogen von Cambridge Isotope Laboratories, aufgelöst in 20 ml Wasser, Dosis von 3 mg/kg Körpergewicht, in nüchternem Zustand). Für den Atemtest wurden in den folgenden 4 Stunden Ausatemproben gesammelt (in den ersten 2 Stunden alle 15 Minuten, danach alle 30 Minuten, jeweils Duplikat-Proben). Die Testpersonen verweilten während der gesamten Untersuchung in einer sitzenden Position und nahmen nach 2 Stunden ein leichtes Frühstück ein (Wasser, Brötchen). Die ^{13}C -CO₂-Gehalte in den Ausatemproben wurden mittels Gas-Isotopen-Verhältnis-Massenspektrometrie gemessen (BreathMAT™, Finnigan, Bremen). Die gegen eine Standard-Gas ermittelten Ergebnisse wurden als delta-delta-Werte berechnet (Promille Differenz zu den vor der Koffein-Gabe ermittelten $^{13}\text{CO}_2$ -Konzentrationen) sowie als kumulative ^{13}C -Exhalation über die Zeit (Prozentsatz der applizierten Gesamt ^{13}C -Dosis, genauere Beschreibung des Berechnungsverfahrens siehe ROST et al., 1992).

Insbesondere die kumulative 120-Minuten Prozent-Dosis wird häufig als Indikator der CYP1A2-abhängigen Koffein-Demethylierung benutzt.

Parallel dazu wurde unmittelbar vor der Koffein-Gabe sowie 30, 120 und 240 Minuten danach Vollblut (5 ml) zur Serumgewinnung entnommen. Aus diesen Proben wurde die Konzentration von Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin, 137X) und die des Hauptmetaboliten Paraxanthin (17X) bestimmt (HPLC-Verfahren, modifiziert nach GRANT et al., 1984). Aus diesen Parametern wurden Ratios von Koffein und Paraxanthin bestimmt sowie die Koffein-Gesamt-Clearance ermittelt (Dosis/AUC, unter Benutzung der linearen Trapez-Formel und Extrapolation bis unendlich mit Hilfe des Programms WinNonlin Version 1.5).

Zudem wurde in den ersten 3 Stunden nach Koffein-Gabe Urin quantitativ gesammelt und sofort eingefroren bei -80°C zur Bestimmung der Konzentration von Koffein und folgender Koffein-Metaboliten (die wichtigsten Metabolisierungswege von Koffein sind in Abbildung 2 beschrieben): 5-Acetylamino-6-Formylamino-3-Methyluracil (AFMU), 1-Methylxanthin (1X), 1-Methylharnsäure (1U, 1-methyluric acid) und 1,7-Dimethylharnsäure (17U, 1,7-dimethyluric acid). Die Messungen erfolgen ebenfalls nach einem modifizierten HPLC-Verfahren, das initial von GRANT et al. (1984) beschrieben wurde. Auf molarer Basis wurden aus den Werten verschiedene Quotienten (siehe Ergebnisteil) ermittelt, die ebenfalls die CYP1A2-Aktivität der Leber widerspiegeln sollen.

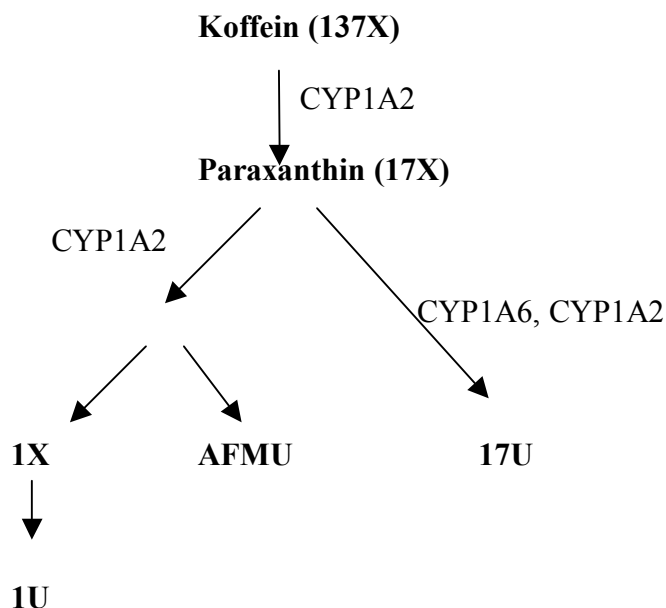


Abbildung 2: Haupt-Metabolisierungswege von Koffein

Bei den TCDD-exponierten Personen aus Wien wurde parallel mit der im Oktober 2000 durchgeführten Untersuchung nach üblichen Verfahren (PÄPKE et al., 1989; PÄPKE 1997) erneut die TCDD-Konzentration im Serum bestimmt (wie zuvor bei der ERGO-Forschungsgesellschaft, Hamburg).

Die Ergebnisse wurden auf statistische Signifikanz ($p < 0,05$) überprüft bei Vergleich von Untergruppen innerhalb des Kontroll-Kollektivs (Mann-Whitney Test). Korrelations-Analysen wurden mit Hilfe des Spearman-Korrelations-Tests vorgenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Immunsystem

Die Ergebnisse der immunologischen Untersuchungen sind in Tabelle 2 dargestellt als statistische Ergebnisse der Kontrollgruppe (n=50; Minimum, 5. Perzentile, Mittelwert, Median, 95. Perzentile und Maximum). Soweit mit Hilfe des Mann-Whitney-Tests signifikante Unterschiede ($p < 0,05$, 3. Spalte) zwischen Nichtrauchern (NR, n=30) und Rauchern (R, n=20) ermittelt wurden, sind zusätzlich die statistischen Ergebnisse für diese beiden Gruppen angegeben. Einzelergebnisse der TCDD-exponierten Personen 1, 2 und 3 sind in den letzten Spalten dargestellt und hervorgehoben, wenn sie unterhalb der 5. oder oberhalb der 95. Perzentile lagen (falls zwischen Nichtrauchern und Rauchern ein signifikanter Unterschied bestand, wurde der Bereich der Nichtraucher als Referenz herangezogen).

Dargestellt sind insgesamt 164 Parameter, die jedoch von ihrer Bedeutung her nicht gleichgewichtig und nicht alle voneinander unabhängig sind (allein 80 Parameter betreffen die Lymphozyten-Proliferation, und hier bis zu 12 Parameter eine bestimmte Funktion durch die verschiedenen Konzentrationen, Vollblut- bzw. PBMC-Messung und Auswertung als cpm bzw. Stimulations-Index). Unter der Annahme, daß die Kontrollpersonen alle immun-gesund waren und die gemessenen Werte der natürlichen Verteilung entsprechen, hat somit jede Person eine Wahrscheinlichkeit von 10%, bei einem bestimmten Parameter außerhalb des Bereichs zwischen der 5. und der 95. Perzentile ("Normalbereich") zu liegen. Von der Zufallserwartung her sollten daher bei jeder untersuchten Person durchschnittlich 16 Parameter auffällig hoch oder niedrig liegen. Tatsächlich lagen bei Person 1, 2 und 3 insgesamt 32, 23 bzw. 17 Parameter außerhalb dieses Bereichs. Es betrafen bei Person 1 allein 10 auffällig hohe Werte die Lymphozyten-Proliferation nach Stimulation mit PHA und PWM, bei Person 2 allein 7 auffällige Werte eine hohe Medium-Kontrolle bei der PBMC-Proliferation nach 3 Tagen mit resultierenden niedrigen Stimulations-Indizes (vermutlich Artefakt), und bei Person 3 allein 7 auffällig hohe Werte die Lymphozyten-Proliferation nach Stimulation mit Tetanus.

Bei Person 1, 2 und 3 lagen insgesamt 9, 12 bzw. 7 Parameter außerhalb des von der Kontrollgruppe gebildeten Werte-Bereichs zwischen Minimum und Maximum (bei Person 2 betrafen davon allein 7 Extremwerte die erwähnte hohe Medium-Kontrolle mit daraus resultierenden niedrigen Stimulations-Indizes). Bei den ausgewerteten 164 Parametern mit 328 Extremwerten (Minimum oder Maximum) wird statistisch 1/50 dieser Extremwerte zufallsbedingt auf eine Einzelperson der Kontrollgruppe entfallen. Wird eine der 3 TCDD-exponierten Personen als vermutet immun-gesund als 51. Person der Kontrollgruppe hinzugefügt, besteht für sie somit eine zufallsbedingte Wahrscheinlichkeit von 1/51 für ihren Beitrag zu den 328 Extremwerten (= 6,4 mal erwartet).

Unter dem Aspekt, daß Immunparameter durch die TCDD-Exposition bei Person 1, 2 und 3 beeinflusst waren und zu einem bestimmten Muster geführt haben könnten, fanden sich bei 7 Parametern gleichsinnige Veränderungen bei zwei der 3 Personen (jedoch nur bei 3 Parametern die beiden hoch TCDD-exponierten Personen 1 und 2 betreffend: hohe Lymphozyten-Zahl,

hohe PBMC-Proliferation nach PWM-Stimulation und niedriger Anteil von CD29^{high}CD49d⁺ bei den CD8-Zellen) und bei einem Parameter gleichsinnige Veränderungen bei allen 3 Personen (Vollblut-Proliferation nach Candida-Stimulation in der höchsten Konzentration); unter Vernachlässigung verschiedener Konzentrationen gilt dies auch für die PHA- und PWM-Stimulation von PBMCs.

Von den insgesamt 72 bei den TCDD-Exponierten außerhalb des "Normbereichs" liegenden Werten betrafen 40 die Lymphozyten-Proliferation. Für die Mitogen-Stimulation fanden sich hohe cpm-Werte bei Person 1 und weniger ausgeprägt auch bei Person 2. Wie erwähnt zeigte sich bei der Antigen-Stimulation bei Person 3 eine hohe Tetanus-Proliferation (letzte Auffrisch-Impfung 1995) und weniger stark auch bei Person 2 (letzte Auffrisch-Impfung 1991), und reagierten alle 3 TCDD-exponierten Personen relativ stark auf Candida.

Wie beschrieben wurde bei den hoch TCDD-exponierten Personen 1 und 2 sowie bei 14 Personen des Kontroll-Kollektivs eine Diphtherie-Boosterimpfung durchgeführt. Die Ergebnisse der 4 bis 6 Wochen später gemessenen Impf-Reaktion (Lymphozyten-Proliferation, Antikörperbildung) sind in Abbildung 3 dargestellt (Person 1 und 2 konnten wegen des hierfür erforderlichen zusätzlichen Fluges nicht noch vor der Impfung untersucht werden; für die Antikörper-Bestimmung vor Impfung wurde eingefrorenes Serum der letzten Voruntersuchung vom März 2000 verwendet). Durchschnittlich wurden nach der Impfung 1,9 mal höhere Proliferations-Werte und 7,6 mal höhere Antikörper-Werte gemessen. Individuell zeigten sich dabei große Differenzen, die bei einzelnen auch gleich hohe oder leicht niedrigere Werte zeigten (im Vergleich zur vor der Impfung erfolgten Untersuchung). Nach der Impfung zeigte Person 1 den niedrigsten Proliferations-Wert von allen 16 Untersuchten, es konnte kein Anstieg des Antikörper-Spiegels gemessen werden. Bei Person 2 lag der Proliferations-Wert im mittleren Bereich, es zeigte sich ein deutlicher Anstieg des Antikörper-Wertes.

Die nur bei den TCDD-exponierten Personen aus Wien gemessenen Immunglobuline IgG, IgA und IgM sowie die IgG-Subklassen lagen innerhalb des an einem größeren Kollektiv ermittelten Normalbereichs.

Unerwartet häufig fanden sich Unterschiede zwischen den Gruppen der Nichtraucher und der starken Raucher: bei den 164 Parametern zeigten sich 34 signifikant ($p < 0,05$; Zufallserwartung ca. 8) unterschiedlich, davon 4 mit $p < 0,001$ und 12 mit $p < 0,01$. Bei diesen 16 hochsignifikanten Unterschieden zeigte sich bei den Rauchern eine höhere Zellzahl im peripheren Blut (Granulozyten, Lymphozyten, % Monozyten), eine geringere intrazelluläre Interferon- γ -Produktion nach Mitogen-Stimulation, eine höhere Lymphozyten-Proliferation im Vollblut nach Candida-Stimulation, ein höherer T-Zell-Anteil bei den Lymphozyten mit höherer CD4/CD8-Ratio bedingt durch eine höhere CD4-Zellzahl, ein niedrigerer Anteil von CD45RO/CD45RA doppelt positiven Zellen bei den CD8-Zellen und ein geringerer Anteil einer Nk-Zell-Subpopulation (CD56⁺CD16⁻) bei den Lymphozyten.

Tabelle 2: Ergebnisse der immunologischen Parameter für die Kontrollgruppe (n=50, angegeben sind Minimum, 5. Perzentile, Mittelwert, Median, 95. Perzentile und Maximum) und die TCDD-exponierten Personen 1, 2 und 3. Statistische Unterschiede zwischen den Untergruppen der Nichtraucher (n=30) und der Raucher (n=20) wurden mit Hilfe des Mann-Withney-Tests ermittelt, der p-Wert ist in der 3. Spalte angegeben. Im Fall eines signifikanten Unterschiedes (p<0,05) sind die Daten der Untergruppen zusätzlich angegeben (kursive Darstellung). Werte der Personen 1, 2 und 3 unterhalb der 5. oder oberhalb der 95. Perzentile sind grau unterlegt.

Parameter	Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
Weißes Blutbild											
Leukozyten	/nl	<0,001	3,98	4,01	7,26	7,03	11,93	13,40	10,70	8,23	5,26
			<i>NR</i> 3,98	<i>4,00</i>	<i>6,29</i>	<i>5,88</i>	<i>9,34</i>	<i>9,39</i>			
			<i>R</i> 4,59	<i>4,65</i>	<i>8,70</i>	<i>8,52</i>	<i>13,34</i>	<i>13,40</i>			
Granulozyten	/nl	<0,01	1,80	1,93	4,13	3,77	8,10	8,84	6,07	4,07	2,37
			<i>NR</i> 1,80	<i>1,84</i>	<i>3,44</i>	<i>3,19</i>	<i>6,19</i>	<i>6,29</i>			
			<i>R</i> 2,17	<i>2,17</i>	<i>5,18</i>	<i>4,94</i>	<i>8,80</i>	<i>8,84</i>			
	% d. Leuko.	n.s.	34,0	36,9	55,5	55,8	71,4	73,5	56,7	49,5	45,1
Lymphozyten	/nl	<0,01	1,19	1,29	2,27	2,37	3,55	3,75	3,80	3,20	2,33
			<i>NR</i> 1,25	<i>1,29</i>	<i>2,05</i>	<i>1,84</i>	<i>3,14</i>	<i>3,23</i>			
			<i>R</i> 1,19	<i>1,22</i>	<i>2,61</i>	<i>2,55</i>	<i>3,75</i>	<i>3,75</i>			
	% d. Leuko.	n.s.	19,3	19,7	32,4	31,6	50,2	51,4	35,5	38,9	44,3
Monozyten	/nl	n.s.	0,22	0,31	0,53	0,49	0,82	0,90	0,71	0,71	0,38
	% d. Leuko.	<0,001	3,0	4,2	7,6	7,7	11,2	13,7	6,6	8,6	7,1
			<i>NR</i> 3,8	<i>4,3</i>	<i>8,4</i>	<i>8,6</i>	<i>13,0</i>	<i>13,7</i>			
			<i>R</i> 3,0	<i>3,1</i>	<i>6,5</i>	<i>6,7</i>	<i>9,7</i>	<i>9,7</i>			
Eosinophile	/nl	n.s.	0,00	0,04	0,24	0,19	0,74	1,10	0,10	0,16	0,10
	% d. Leuko.	n.s.	0,0	0,6	3,3	2,6	9,1	12,6	1,0	2,0	1,9

Parameter	Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
Basophile	/nl	n.s.	0,04	0,04	0,08	0,07	0,13	0,15	0,05	0,09	0,08
	% d. Leuko.	<0,05	0,4	0,6	1,1	1,0	1,7	1,8	0,5	1,1	1,5
		NR	0,4	0,6	1,2	1,1	1,7	1,8			
		R	0,5	0,5	1,0	1,0	1,6	1,6			
Ratio: Gran./Lymph.		n.s.	0,66	0,74	1,91	1,74	3,63	3,81	1,60	1,27	1,02
Chemilumineszenz											
Maximum	Lum. Einheiten	<0,05	28,1	28,3	38,0	38,0	52,6	60,1	36,2	34,4	37,5
		NR	28,1	28,1	36,6	36,4	52,2	60,1			
		R	29,2	29,3	40,1	40,5	54,2	54,4			
Zeit bis Maximum	Sek.	n.s.	840	857	1072	1080	1260	1470	1320	1200	1170
Zytokin-Sekretion PBMCs											
IL-5 (Tag 1)	pg/ml	n.s.	5,0	65	243	223	567	659	30	124	49
IL-5 (Tag 3)	pg/ml	n.s.	7,2	105	414	374	1140	1360	36	308	161
γ -IFN (Tag 1)	pg/ml	n.s.	61	86	2099	1485	8780	11865	7794	4416	5640
γ -IFN (Tag 3)	pg/ml	n.s.	134	498	20767	12240	76200	91755	40200	49080	53430
Intrazelluläre Zytokin-Produktion											
IL-2+											
bei CD3 ⁺ Zellen	%	n.s.	26,0	32,1	45,1	44,9	59,2	61,3	36,3	35,3	53,9
bei CD4 ⁺ Zellen	%	n.s.	40,8	45,4	57,4	57,9	70,0	71,6	49,6	46,1	64,8
bei CD8 ⁺ Zellen	%	n.s.	13,9	15,0	27,7	27,7	45,0	47,7	20,4	16,1	22,6
IL-4+											
bei CD3 ⁺ Zellen	%	n.s.	0,9	1,4	3,6	3,3	6,7	7,5	0,9	5,9	4,9
bei CD4 ⁺ Zellen	%	<0,05	1,3	2,0	4,7	4,5	8,7	9,5	1,3	7,1	5,9
		NR	1,3	1,6	5,3	5,1	9,2	9,5			
		R	2,2	2,2	4,0	4,1	6,5	6,5			
bei CD8 ⁺ Zellen	%	n.s.	0,4	0,6	2,9	2,6	6,1	9,2	0,7	3,9	3,4

Parameter	Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
Interferon-γ+											
bei CD3 ⁺ Zellen	%	<0,01	14,0	15,7	34,3	31,2	57,4	67,6	19,1	35,2	28,8
		<i>NR</i>	17,6	17,8	38,6	37,6	62,2	67,6			
		<i>R</i>	14,0	14,1	27,8	26,9	54,4	54,7			
bei CD4 ⁺ Zellen	%	<0,01	12,0	13,9	31,5	30,2	55,5	67,6	16,5	32,9	28,2
		<i>NR</i>	12,0	14,9	35,6	33,1	61,6	67,6			
		<i>R</i>	12,3	12,5	25,2	23,2	44,1	44,5			
bei CD8 ⁺ Zellen	%	<0,01	12,7	19,1	42,1	37,4	67,6	74,0	24,9	44,5	35,2
		<i>NR</i>	19,8	22,5	47,5	47,1	70,7	74,0			
		<i>R</i>	12,7	13,0	34,0	30,4	65,4	65,5			
Lymphozyten-Proliferation											
Medium-Kontrolle											
Vollblut	3 Tage cpm	n.s.	9	10	18	16	35	54	15	25	16
	5 Tage cpm	<0,05	9	9	17	15	30	34	23	18	12
		<i>NR</i>	9	9	15	14	28	31			
		<i>R</i>	12	12	19	18	34	34			
PBMCs	3 Tage cpm	n.s.	51	110	303	265	612	1180	195	1851	255
	5 Tage cpm	n.s.	71	103	340	263	804	958	278	376	384
PHA											
Vollblut	1 µg/ml cpm	n.s.	106	707	21919	20231	44786	59566	46846¹⁾	38775	17639
	3 µg/ml cpm	n.s.	45078	54510	72380	69299	94848	105594	53597¹⁾	74725	66440
	10 µg/ml cpm	n.s.	49110	52725	69287	71286	87117	90796	65880	88958	65788
SI	1 µg/ml	n.s.	8	42	1351	1202	3372	3550	3123	1551	1138
	3 µg/ml	n.s.	1027	2007	4614	4458	7581	8538	3573	2989	4286
	10 µg/ml	n.s.	1087	1981	4464	4439	7577	8836	4392	3558	4244

Parameter			Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
PBMCs	1 µg/ml	cpm		n.s.	108	1163	41679	44155	92704	99574	93383	65946	27016
	3 µg/ml	cpm		n.s.	4139	55741	86589	89025	108826	112596	100289	115548	111446
	10 µg/ml	cpm		n.s.	54074	59865	85279	86346	109415	116475	89323	105785	105258
SI	1 µg/ml			n.s.	2	6	163	133	604	678	479	36 ²⁾	106
	3 µg/ml			n.s.	64	127	357	309	738	833	514	62 ²⁾	438
	10 µg/ml			n.s.	72	149	366	312	821	1060	458	57 ²⁾	414
PWM													
Vollblut	0,5 µg/ml	cpm		n.s.	4082	5483	10679	10851	19149	19968	22796	15644	7647
	1,5 µg/ml	cpm		n.s.	6150	6525	13540	13128	24827	26787	36131	16203	10318
	5,0 µg/ml	cpm		n.s.	5463	6084	13177	12115	24667	26685	25338	17947	9292
SI	0,5 µg/ml			n.s.	121	261	676	639	1222	1632	1520	626	493
	1,5 µg/ml			n.s.	142	298	858	786	1612	1863	2409	648	666
	5,0 µg/ml			n.s.	160	285	830	745	1673	1929	1689	718	599
PBMCs	0,5 µg/ml	cpm		n.s.	6488	11796	29338	28911	46459	50422	46835	47886	44466
	1,5 µg/ml	cpm		n.s.	5325	9032	26637	25971	42770	60822	41883	35639	47885
	5,0 µg/ml	cpm		n.s.	4169	7847	24508	24234	45511	55878	32436	24452	44871
SI	0,5 µg/ml			<0,05	30	33	128	100	374	438	240	26 ²⁾	175
				NR	30	30	111	86	374	388			
				R	65	65	153	119	429	438			
	1,5 µg/ml			<0,05	21	27	116	89	289	553	215	19 ²⁾	188
				NR	21	23	97	85	289	303			
				R	54	54	145	108	537	553			
	5,0 µg/ml			n.s.	19	24	107	84	269	508	166	13 ²⁾	176

Parameter			Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
Interleukin 2													
Vollblut SI		cpm	n.s.	836	857	2082	1557	5512	11659	1583	2648	1378	
			<0,05	49	51	122	98	287	431	106	106	89	
			NR	49	50	140	112	391	431				
			R	51	51	95	84	200	201				
PBMCs SI		cpm	n.s.	1410	2329	8018	7268	18640	23470	3174	13159	6445	
			n.s.	8	10	30	28	54	97	16	7 ²⁾	25	
Diphtherie													
Vollblut SI	10 Lf/ml	cpm	n.s.	12	13	1311	640	5593	6742	46	101	1860	
	20 Lf/ml	cpm	n.s.	12	18	1872	815	6342	9399	31	699	3104	
	40 Lf/ml	cpm	n.s.	21	25	1933	1133	8917	10450	74	1764	6024	
	10 Lf/ml		n.s.	1	1	82	38	418	605	2	6	162	
	20 Lf/ml		n.s.	1	1	113	63	397	700	1	39	270	
	40 Lf/ml		n.s.	2	2	121	69	423	821	3	98	524	
PBMCs SI	10 Lf/ml	cpm	n.s.	695	854	9095	5011	34031	45198	4827	3176	16768	
	20 Lf/ml	cpm	n.s.	751	1149	11000	7228	42960	48862	7630	5954	15858	
	40 Lf/ml	cpm	n.s.	1589	2259	12914	8968	44585	56252	6752	12855	18611	
	10 Lf/ml		n.s.	1	5	31	18	122	128	17	8	44	
	20 Lf/ml		n.s.	3	5	39	23	139	171	27	16	41	
	40 Lf/ml		n.s.	7	7	48	28	160	233	24	34	49	
Tetanus													
Vollblut SI	10 Lf/ml	cpm	n.s.	33	65	3701	1711	13928	16640	1535	1800	18602	
	20 Lf/ml	cpm	n.s.	26	85	5399	3435	17160	26119	1819	4975	15178	
	40 Lf/ml	cpm	n.s.	81	334	8238	7252	19777	24955	5329	14411	22371	
	10 Lf/ml		n.s.	3	4	218	113	813	1009	67	100	1618	
	20 Lf/ml		n.s.	1	7	327	229	1141	1598	79	276	1320	
	40 Lf/ml		n.s.	6	20	498	517	1278	1830	232	801	1945	

Parameter			Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
PBMCs	10 Lf/ml	cpm		n.s.	1822	3251	17056	14653	38990	49977	7322	44123	39318
	20 Lf/ml	cpm		n.s.	3612	4882	21038	19214	44976	51968	12834	44952	51971
	40 Lf/ml	cpm		n.s.	3270	6184	24993	22692	52145	59859	15565	36524	47638
SI	10 Lf/ml			n.s.	7	10	62	56	159	188	26	118	103
	20 Lf/ml			n.s.	15	18	77	65	195	223	46	120	136
	40 Lf/ml			n.s.	18	25	93	84	228	240	56	97	124
Candida													
Vollblut	0,05U/ml	cpm	<0,05		10	22	1729	666	6618	11513	9187	2794	3787
				NR	10	17	1120	505	3929	4126			
				R	21	27	2644	1377	11280	11513			
	0,15 U/ml	cpm	<0,01		12	631	5805	4663	15399	19321	8867	16614	8603
				NR	12	308	4222	3297	13596	14296			
				R	1019	1033	8179	8437	19192	19321			
	0,5 U/ml	cpm	<0,05		207	786	3800	2881	8628	20300	9698	15985	10663
				NR	207	325	2871	2623	6638	7175			
				R	1319	1341	5194	4266	19805	20300			
SI	0,05 U/ml		n.s.		1	2	106	43	362	886	399	155	329
	0,15 U/ml		<0,05		1	46	355	279	966	1288	386	923	748
				NR	1	31	274	237	758	789			
	0,5 U/ml		n.s.		38	39	475	411	1279	1288			
				R	38	39	475	411	1279	1288			
					17	56	231	207	612	905	422	888	927
PBMCs	0,05 U/ml	cpm	n.s.		451	965	7062	5806	15724	26578	13459	12877	9134
	0,15 U/ml	cpm	n.s.		11	24	3822	2717	11632	38818	4859	5611	2545
	0,5 U/ml	cpm	n.s.		13	16	49	27	181	400	47	19	26
SI	0,05 U/ml		n.s.		4	5	25	22	65	71	48	34	24
	0,15 U/ml		n.s.		0	0	13	7	55	80	17	15	7
	0,5 U/ml		n.s.		0	0	0	0	1	4	0	0	0

Parameter	Einheit		P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3	
Staphylococcus Enterotoxin B													
Vollblut	12 ng/ml	cpm	n.s.	18543	35832	67984	70686	97269	112520	69203	80257	62619	
		36 ng/ml	cpm	n.s.	24498	38655	72376	74195	96202	106032	71125	74975	81147
		120 ng/ml	cpm	n.s.	22635	37951	77150	79908	103022	105150	74042	78832	77626
	SI	12 ng/ml	n.s.	1854	2092	4468	4115	8247	11252	3009	4459	5445	
		36 ng/ml	n.s.	2021	2229	4815	4362	9147	10603	3092	4165	7056	
		120 ng/ml	<0,05	2204	2246	5126	4443	9838	10515	3219	4380	6750	
			NR	2264	2444	5608	4764	10236	10515				
			R	2204	2205	4402	3983	7977	8035				
PBMCs	12 ng/ml	cpm	n.s.	28210	32843	52142	51437	71555	80234	62008	48879	53625	
		36 ng/ml	cpm	n.s.	26477	32699	53642	53023	78838	83303	63669	58740	55341
		120 ng/ml	cpm	n.s.	31372	35849	56959	56006	83471	88753	62527	56766	57187
	SI	12 ng/ml	n.s.	48	53	225	211	579	708	223	130	140	
		36 ng/ml	n.s.	49	57	227	221	541	742	229	156	144	
		120 ng/ml	n.s.	51	61	240	234	630	724	225	151	149	
Lymphozyten-Subpopulationen													
T-Zellen													
CD3+	% d. Lymph. /nl	n.s.	48,5	59,5	72,0	71,8	83,4	83,9	83,6 3,18	65,0	65,6		
		<0,01	0,83	0,87	1,64	1,59	2,66	2,80		2,08	1,53		
		NR	0,83	0,85	1,46	1,32	2,42	2,53					
		R	0,95	0,97	1,90	1,86	2,80	2,80					
γd ⁺	% d. CD3 ⁺ Zell.	<0,05	1,1	1,4	6,0	5,0	14,9	18,9	2,5	9,7	3,2		
		NR	2,0	2,3	6,9	6,3	16,5	18,9					
		R	1,1	1,1	4,7	3,1	15,1	15,3					

Parameter	Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
CD4 ⁺	% d. CD3 ⁺ Zell.	<0,01	40,6	44,0	57,9	58,0	70,3	72,3	54,4	61,4	72,8
		NR	40,6	42,0	55,3	55,3	67,8	69,3			
		R	49,1	49,3	61,7	64,2	72,3	72,3			
CD8 ⁺	% d. CD3 ⁺ Zell.	<0,01	22,9	24,9	35,5	34,8	48,9	53,6	42,3	28,2	23,1
		NR	22,9	24,4	37,4	36,6	51,1	53,6			
		R	24,0	24,1	32,6	31,3	44,7	44,9			
Ratio: CD4/CD8		<0,01	0,8	0,9	1,7	1,6	2,8	3,0	1,3	2,2	3,2
		NR	0,8	0,8	1,6	1,5	2,8	3,0			
		R	1,1	1,1	2,0	2,0	3,0	3,0			
CD4 ⁺	% d. Lymph.	<0,01	24,8	31,5	43,4	42,2	56,0	56,8	45,6	42,6	48,7
		NR	24,8	28,0	40,6	40,7	51,7	53,5			
		R	35,7	35,7	47,7	49,4	56,8	56,8			
	/nl	<0,001	0,47	0,52	0,99	0,96	1,81	1,97	1,73	1,36	1,13
		NR	0,47	0,49	0,83	0,80	1,41	1,43			
		R	0,63	0,64	1,23	1,22	1,96	1,97			
CD25 ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	<0,05	29,5	35,0	46,2	46,6	62,2	66,7	51,1	48,7	46,0
		NR	29,5	32,4	43,9	44,5	54,6	55,7			
		R	37,5	37,6	49,6	47,3	66,5	66,7			
HLADR ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	3,1	3,2	5,4	5,1	9,7	11,1	3,8	5,3	3,5
CD62L ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	61,9	64,5	81,8	83,2	91,7	93,7	77,7	70,7	83,5
CD26 ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	70,6	77,4	87,2	88,2	91,8	93,0	83,7	76,4 ³⁾	92,4 ³⁾
CD29 ^{high}	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	49,6	50,4	62,6	61,7	75,6	78,1	51,1	66,5	54,7
CD29 ^{high} CD49d ⁻	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	4,6	6,1	10,6	9,6	18,6	22,6	6,0	10,0	12,3
CD29 ^{high} CD49d ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	41,1	41,8	53,0	53,4	64,2	69,5	45,5	57,7	43,6
CD29 ^{low} CD49d ⁻	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	0,6	0,8	2,0	1,7	4,2	5,5	2,3	2,6	1,9
CD29 ^{low} CD49d ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	20,9	22,4	34,5	34,8	46,8	47,7	46,3	29,8	42,3

Parameter	Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
CD29 ^{high} CD45RO ⁻	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	11,1	13,6	22,5	22,5	30,8	38,2	17,0	20,8	18,3
CD29 ^{high} CD45RO ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	25,2	25,9	39,2	39,2	55,2	57,0	33,6	44,4	35,3
CD29 ^{low} CD45RO ⁻	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	16,5	18,5	31,4	32,2	44,3	46,2	40,2	23,6	37,1
CD29 ^{low} CD45RO ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	2,7	4,0	7,0	7,1	10,3	11,0	9,2	11,2	9,3
CD11a ^{high} CD45RO ⁻	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	2,6	3,0	6,7	6,3	14,2	14,5	4,1	15,4	4,9
CD11a ^{high} CD45RO ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	15,5	17,7	32,0	30,7	47,8	49,2	23,3	27,1	28,8
CD11a ^{low} CD45RO ⁻	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	26,3	27,6	45,5	45,0	61,9	64,5	52,7	37,9	50,6
CD11a ^{low} CD45RO ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	<0,05	9,4	9,8	15,8	14,5	23,4	27,2	20,0	19,7	15,7
		NR	9,4	9,7	16,8	17,0	25,3	27,2			
		R	9,6	9,7	14,2	13,8	19,5	19,6			
CD11a ^{high}	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	19,7	24,1	38,7	37,6	54,0	54,5	27,4	42,5	33,7
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	27,8	29,0	45,6	45,9	63,5	66,6	43,1	51,9	40,6
CD45RO ⁺ CD45RA ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	7,4	9,0	15,3	14,6	25,7	33,1	9,7	22,2	20,9
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺	% d. CD4 ⁺ Zell.	n.s.	18,4	22,2	39,1	39,4	53,6	56,0	47,1	25,8	38,6
CD8+	% d. Lymph.	n.s.	22,3	23,7	33,1	32,2	46,5	49,0	39,6	25,4	24,5
	/nl	n.s.	0,35	0,39	0,75	0,73	1,43	1,49	1,51	0,81	0,57
CD25 ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	4,1	4,4	8,6	7,8	14,8	22,5	6,1	8,5	7,2
HLADR ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	4,1	5,7	12,3	10,5	31,6	34,5	9,5	11,9	10,3
CD62L ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	35,6	37,1	54,6	55,1	72,5	80,5	60,2	46,1	40,2
CD26 ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	30,7	33,4	54,9	56,4	73,5	79,9	65,1	46,3	46,5

Parameter	Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
CD45RO ⁺ CD45RA ⁻	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	6,1	8,8	22,1	20,0	40,6	58,3	16,4	28,5	13,0
CD45RO ⁺ CD45RA ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	<0,001	7,8	11,2	17,0	15,9	25,4	32,3	11,6	20,5	18,1
		NR	12,7	12,8	18,9	16,9	29,2	32,3			
		R	7,8	7,8	14,3	13,8	n. berechnet	24,1			
CD45RO ⁻ CD45RA ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	<0,05	26,4	42,1	60,8	63,4	76,3	80,1	72,0	50,9	68,9
		NR	41,2	42,2	58,5	59,1	75,5	76,2			
		R	26,4	26,4	64,3	65,7	n. berechnet	80,1			
CD29 ^{high} CD49d ⁻	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	2,9	3,4	6,7	6,3	12,0	15,6	1,5	3,3	5,7
CD29 ^{high} CD49d ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	40,0	44,0	56,5	57,1	70,1	73,9	41,0	58,7	52,6
CD29 ^{low} CD49d ⁻	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	2,1	3,0	6,7	6,8	10,9	11,7	4,9	7,1	9,0
CD29 ^{low} CD49d ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	15,4	17,5	30,1	29,9	44,2	46,6	52,6	30,9	32,7
CD29 ^{high}	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	44,2	49,0	63,2	63,0	75,5	80,6	42,5	62,0	58,3
CD49 ⁺	% d. CD8 ⁺ Zell.	n.s.	75,0	78,4	86,6	86,9	93,8	94,5	93,6	89,6	85,3
CD11a ^{high}	% d. CD8 ⁺ Zell.	<0,05	25,1	32,2	52,9	52,7	74,7	78,4	43,9	62,9	53,6
		NR	38,2	38,9	56,2	55,9	74,7	76,7			
		R	25,1	25,2	47,9	48,3	77,9	78,4			
B-Zellen											
CD19 ⁺	% d. Lymph.	n.s.	3,4	4,8	9,7	9,5	16,9	17,6	7,3	24,3	7,6
	/nl	<0,05	0,07	0,09	0,22	0,20	0,42	0,47	0,28	0,78	0,18
		NR	0,08	0,09	0,19	0,17	0,43	0,47			
		R	0,07	0,07	0,26	0,28	0,42	0,42			
CD23 ⁺	% d.CD19 ⁺ Zell.	n.s.	10,0	11,3	30,1	27,8	52,6	64,9	32,8	27,5	48,5

Parameter	Einheit	P (R-NR)	Min.	5. Perz.	Mittelwert	Median	95. Perz.	Max.	Person 1	Person 2	Person 3
Nk-Zellen											
CD56/CD16 ⁺ CD3 ⁻	% d. Lymph. /nl	n.s.	3,5	4,0	13,0	12,2	23,6	35,8	7,5	5,9	22,4
		n.s.	0,06	0,10	0,30	0,27	0,73	0,98	0,28	0,19	0,52
CD56 ⁺ CD16 ⁻ CD3 ⁻	% d. Lymph.	<0,01	0,4	0,5	1,2	1,0	2,1	3,1	0,5	0,4	1,3
		NR	0,7	0,8	1,3	1,2	2,0	2,1			
		R	0,4	0,4	1,1	0,9	3,0	3,1			
CD56 ⁺ CD16 ⁺ CD3 ⁻	% d. Lymph.	n.s.	2,6	2,6	10,8	10,5	20,9	30,5	6,8	5,2	18,8
CD56 ⁻ CD16 ⁺ CD3 ⁻	% d. Lymph.	n.s.	0,2	0,2	1,0	0,7	3,4	3,6	0,2	0,3	2,2
CD8 ⁺ CD56 ⁺ CD3 ⁻	% d. Lymph.	n.s.	0,7	1,1	5,1	4,4	11,1	14,0	1,4	2,5	6,2
IgE											
	IU/ml	<0,05	2,25	3,22	137,0	51,6	776	1017	3,97	5,02	14,4
		NR	2,25	2,28	89,0	35,1	491	589			
		R	4,43	5,10	208,8	54,9	1006	1017			
Spezifische Antikörper											
Tetanus (IgG)	IU/ml	n.s.	20	48	513	362	1905	3439	43	169	549
Diphtherie	IU/ml	n.s.	0,01	0,01	0,25	0,20	0,92	1,22	0,01	0,01 ⁴⁾	0,06

Anmerkungen:

¹⁾ hohe Proliferation bereits bei der niedrigsten Konzentration kann bei höheren Konzentrationen durch Überstimulation zu niedrigeren oder nur leicht höheren cpm-Werten führen (insbesondere durch zu hohen Verbrauch von Nährstoffen)

²⁾ niedrige Werte bedingt durch ungewöhnliche hohe Werte bei der Medium-Kontrolle

³⁾ cave: gegensinnige Veränderungen!

⁴⁾ nach Booster: 0,09 IU/ml

5.2. Cytochrom P450-Aktivität der Leber (CYP1A2)

Die Cytochrom P450 1A2-Aktivität (CYP1A2) wurde indirekt als Koffein-Demethylierung gemessen, für die die folgenden 10 Parameter ausgewertet wurden: kumulative 15, 120 und 240 Minuten % Dosis im Atemtest (AT15, AT120, AT240), Serum Metaboliten Ratio (Paraxanthin/Koffein) nach 30, 120 und 240 Minuten (SMR30, SMR120, SMR240), Gesamt-Clearance (CL) und Urin-Metaboliten-Ratios $(AFMU+1U+1X)/17U$ (UMR1), $(17X+17U)/137X$ (UMR2) und $17X/137X$ (UMR3). Die Korrelation dieser Parameter untereinander ist in Tabelle 3 dargestellt (Spearman Rang-Korrelationsanalyse). Wie erwartet, waren die Korrelationen überwiegend hoch positiv. Lediglich die von UMR1 mit UMR2 und UMR3 war nicht signifikant. Bei Vergleich der verschiedenen Testprinzipien (AT, SMR, CL und UMR) fanden sich die höchsten Korrelations-Koeffizienten für AT15 und CL, die niedrigsten für SMR240 und UMR1.

Die Werte für die Gruppe der Nichtraucher (n=30) und der Raucher (n=20) sind in Tabelle 4 dargestellt für die 10 ausgewerteten Parameter, zusammen mit den Werten für die TCDD-exponierten Personen 1, 2 und 3 (Einzelwerte für die zwei bis vier durchgeführten Messungen). Die Ergebnisse sind zusätzlich graphisch in Abbildung 4 a-i dargestellt (für die Kontrollgruppe in Abhängigkeit von der Anzahl der gerauchten Zigaretten).

Die Untersuchungsergebnisse bestätigten die bekannte Induktion der CYP1A2-Aktivität durch Zigaretten-Rauchen (Abbildung 4 a-i). Wie aus Tabelle 4 hervorgeht, zeigte sich die höchsten Differenzen in den Mittelwerten von Nichtrauchern und Rauchern bei AT15 (Faktor 1,82) und UMR1 (Faktor 1,79), die niedrigsten für UMR2 (Faktor 1,46) und UMR3 (Faktor 1,42). Alle Differenzen waren statistisch hochsignifikant ($p < 0,001$, Mann-Whitney-Test), bis auf die beiden letztgenannten Parameter mit deutlich geringerer Signifikanz ($p < 0,05$). In Tabelle 3 ist zusätzlich die Korrelation der verschiedenen gemessenen Parameter mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten angegeben: Spearman Rang-Korrelations-Koeffizienten lagen zwischen 0,53 (SMR30) und 0,69 (CL) ($p < 0,0001$), bis auf die Werte für UMR2 und UMR3 mit niedrigeren Werten (jeweils 0,34; $p < 0,05$). Innerhalb der Untergruppe der Raucher fanden sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Benutzung von Filtern (bei den meisten Parametern fanden sich höhere Mittelwerte bei den Rauchern ohne Filter, der mit einem höheren Zigarettenkonsum assoziiert war: 32,8 pro Tag durchschnittlich gegenüber 23,5 pro Tag bei Filterbenutzern).

Ein Vergleich von Frauen und Männern innerhalb der Kontrollgruppe (jeweils n=25) zeigte signifikant höhere Mittelwerte bei den Männern nur bei den Atemtest-Ergebnissen (AT15, AT120 und AT240) und UMR2 ($p < 0,05$), die mit einem höheren Zigarettenkonsum bei den männlichen Rauchern assoziiert waren (27,5 pro Tag) im Vergleich zu den Raucherinnen (22,5 pro Tag). Die Beschränkung der Auswertung auf die Nichtraucher/innen (jeweils n=15) zeigte sogar höhere Signifikanzen bei den Geschlechtsunterschieden für die erwähnten vier Parameter ($p < 0,01$), während bei den übrigen sechs Parametern weiterhin keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden konnten.

Bei den hoch TCDD-exponierten Personen 1 und 2 zeigten acht der zehn gemessenen Parameter eine starke Induktion der CYP1A2-Aktivität, während die Ergebnisse von UMR2 und UMR3 nicht außerhalb des Streubereichs von Nichtrauchern und Rauchern lagen (Abbildung 4 a-j, Tabelle 4). Bei den Ergebnissen des Atemtests waren die Mittelwerte von Person 1 (vier Messungen zwischen Dezember 1998 und Oktober 2000) 7,9-(AT15), 7,0-(AT30), 5,7-(AT60), 4,4-(AT120) und 3,0-fach (AT240) höher als die Mittelwerte von Nichtrauchern. Die entsprechenden Werte von Person 2 waren 9,6-, 8,8-, 7,4-, 5,6- und 3,7-fach höher. Entgegen der sonstigen Darstellung sind hier auch die kumulativen 30 und 60 Minuten % Dosis-Werte angegeben, da sich mit längerem Testintervall ein zunehmend geringer werdender Unterschied zum Mittelwert von Nichtrauchern darstellte. In diesem Phänomen spiegelt sich der starke Anstieg der delta-delta-Werte bei den Personen 1 und 2 wider, für die bereits bei der ersten Messung 15 Minuten nach Koffein-Applikation das Maximum erreicht wurde (Abbildung 5). Die schnelle Metabolisierung von Koffein bei ihnen zeigte sich auch in den nach 30 Minuten erstmals im Serum gemessenen Koffein-Werten, die mit 4,0 mg/l beziehungsweise 3,0 mg/l die niedrigsten waren im Vergleich zur Kontrollgruppe (Minimum 4,2 mg/l, Median 5,8 mg/l, Maximum 8,8 mg/l). Bei den anderen Parametern der CYP1A2-Aktivität (Mittelwerte von drei Messungen) zeigten sich jeweils für Person 1 und 2 im Vergleich zu Mittelwerten von Nichtrauchern 11,3- und 9,6-fach (SMR30), 10,2 und 9,9-fach (SMR120), 6,4- und 7,0-fach (SMR240), 9,6- und 8,1-fach (CL), 9,3- und 9,1-fach (UMR1), 2,7- und 1,7-fach (UMR2), und 1,9- und 2,0-fach (UMR3) höhere Werte.

Bei der moderat TCDD-exponierten Person 3 zeigten die Mittelwerte von zwei Messungen im Vergleich zu Mittelwerten der Nichtraucher bei den verschiedenen Parametern die folgenden Differenzen: 1,7-fach (AT15), 1,8-fach (AT120), 1,7-fach (AT240), 1,4-fach (SMR30), 1,6-fach (SMR120), 1,6-fach (SMR240), 1,0-fach (CL), 3,6-fach (UMR1), 0,6-fach (UMR2) und 0,9-fach (UMR3). Bei AT120 und AT240 lagen die Einzelergebnisse nahe der 95. Perzentile von Nichtrauchern bzw. nahe dem Mittelwert von Rauchern. Die bei Person 3 am stärksten erhöhten Werte von UMR1 lagen deutlich über der 95. Perzentile von Nichtrauchern und gehörten auch innerhalb der Raucher-Gruppe zu den höchsten gemessenen (Abbildung 4, Tabelle 4).

Insgesamt zeigten die bei den Personen 1, 2 und 3 zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Parameter der CYP1A2 Aktivität eine gute Reproduzierbarkeit. Trotz mit der Zeit abfallender TCDD-Werte konnte keine eindeutig abfallende Tendenz bei den gemessenen Werten der CYP1A2 Aktivität beobachtet werden. Als Beispiel wurden die Ergebnisse von AT120 in Abbildung 6 graphisch in Abhängigkeit zu den gemessenen TCDD-Konzentrationen dargestellt (inklusive der Einzelwerte von Nichtrauchern, für die ein TEQ-Wert 15 ppt für 2,3,7,8-substituierte PCDDs/PCDFs angenommen wurde).

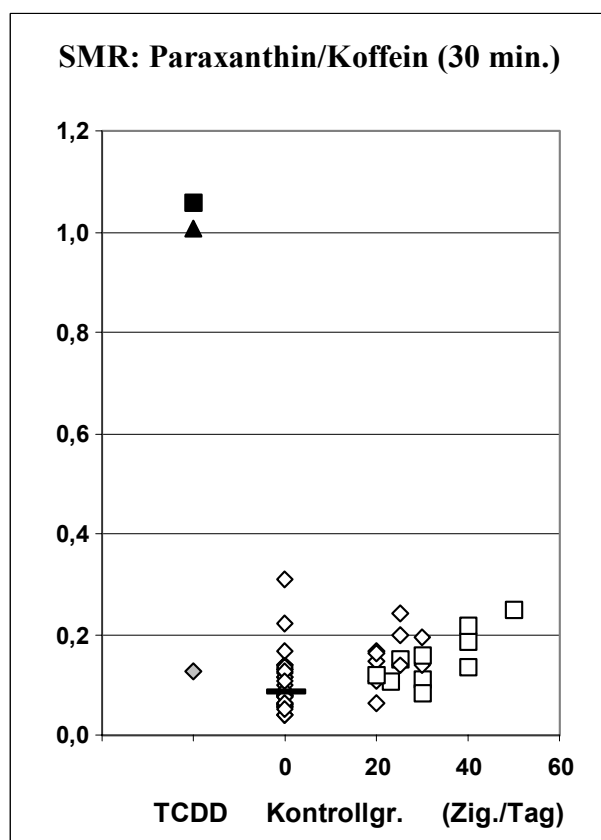
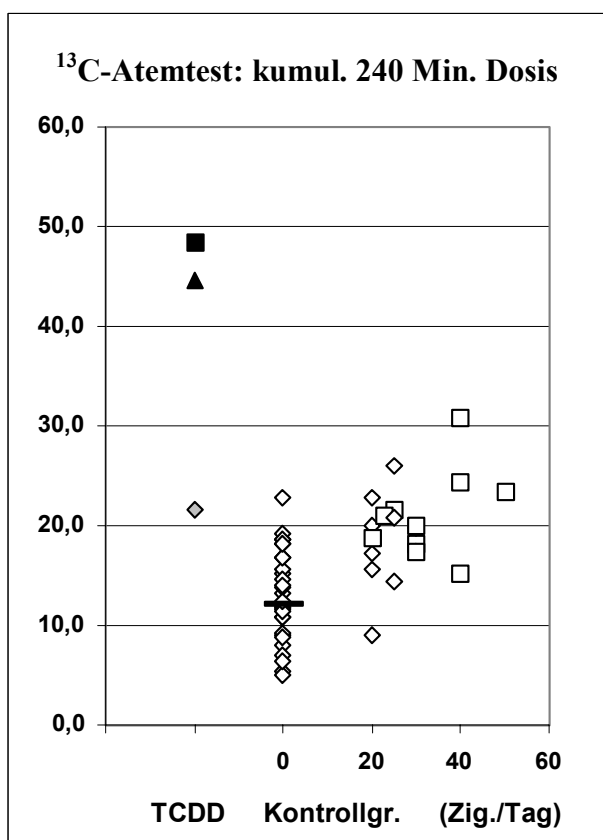
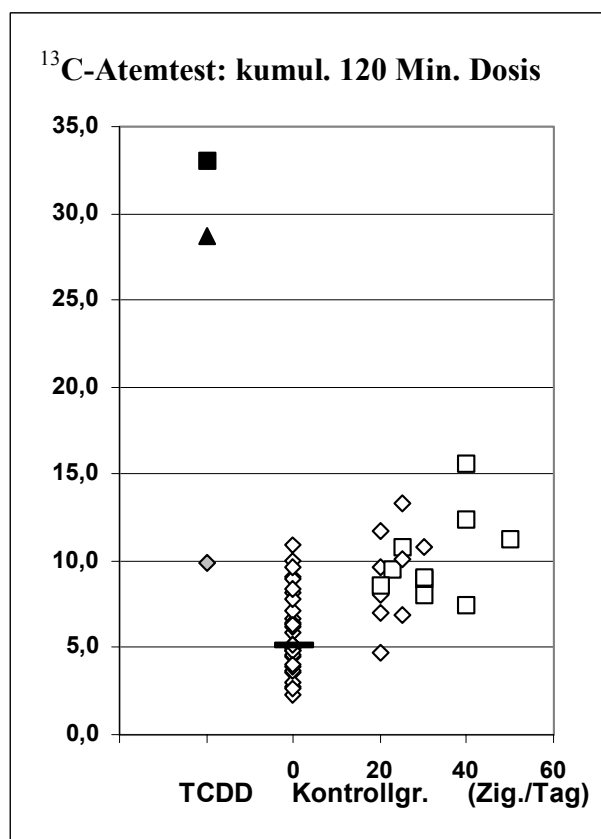
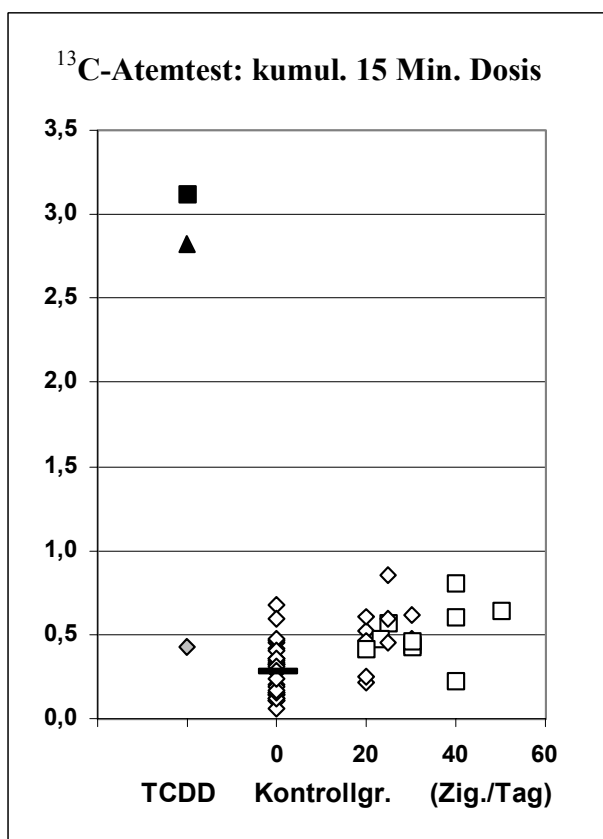


Abbildung 4 a-d (Legende: übernächste Seite)

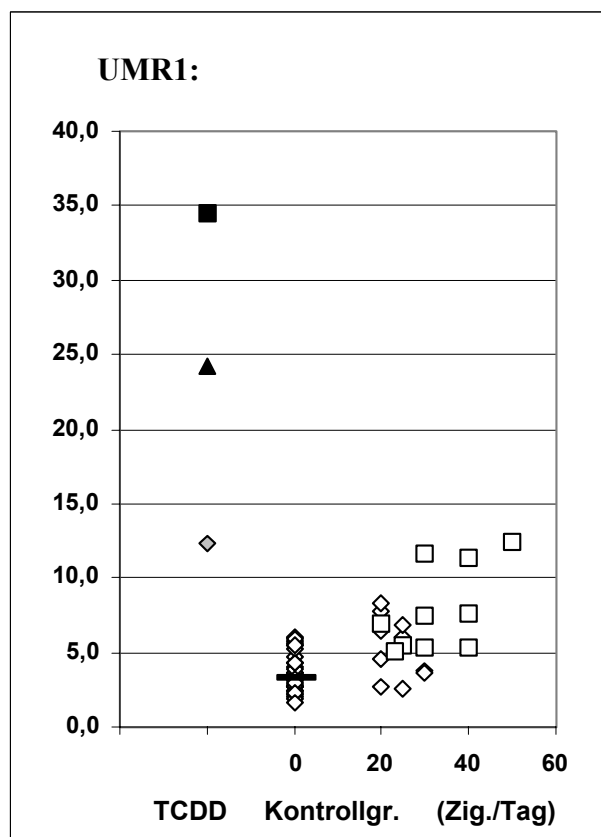
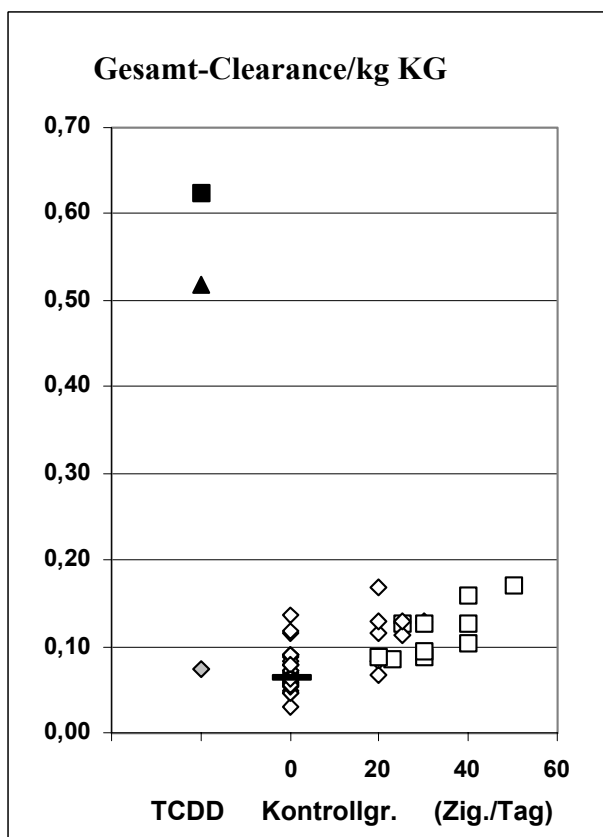
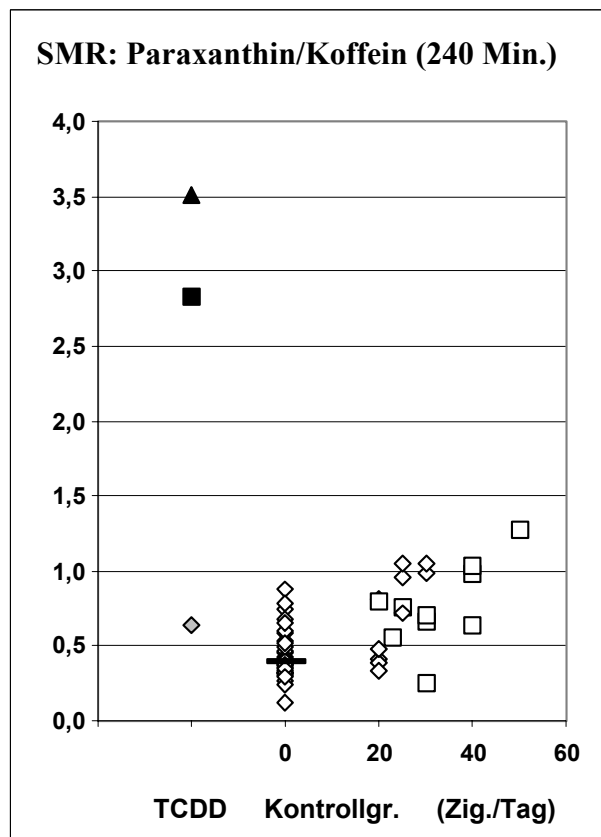
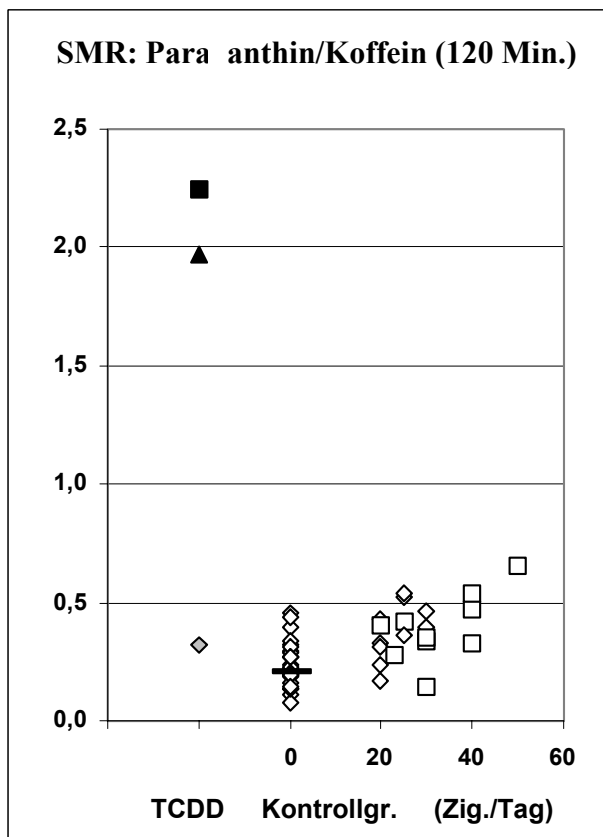


Abbildung 4 e-h (Legende: nächste Seite)

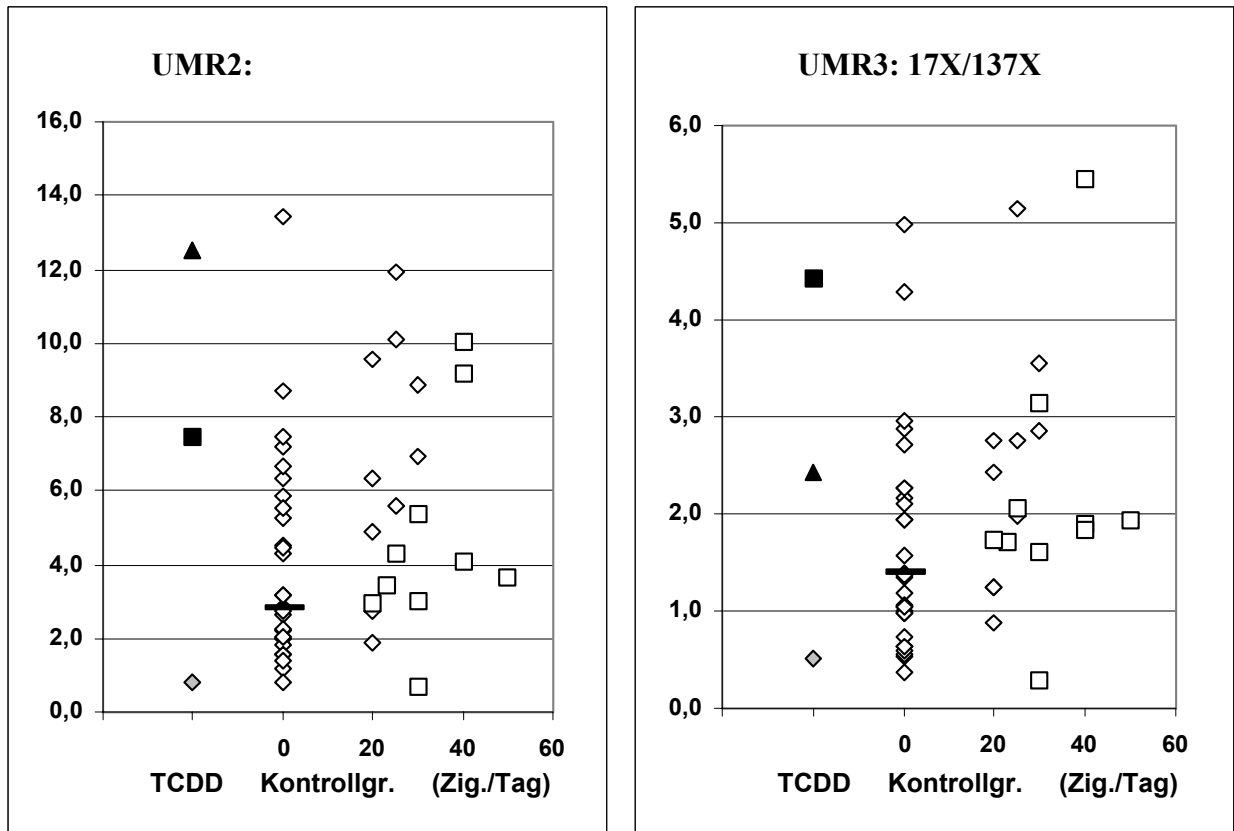


Abbildung 4 i-j

Graphische Darstellung der 10 ausgewerteten Parameter der Koffein-Demethylierung für die TCDD-exponierten Personen 1 (schwarzes Dreieck), 2 (schwarzes Quadrat) und 3 (grauer Diamant), sowie für die Kontrollgruppe (leere Symbole, aufgetragen gegen die Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten): Nichtraucher (n=30, mit als “-” dargestelltem Median-Wert) und starken Rauchern (n=20, Quadrate: keine Filter-Benutzung). Die Daten der TCDD-exponierten Personen stammen von der Untersuchung im Oktober 2000.

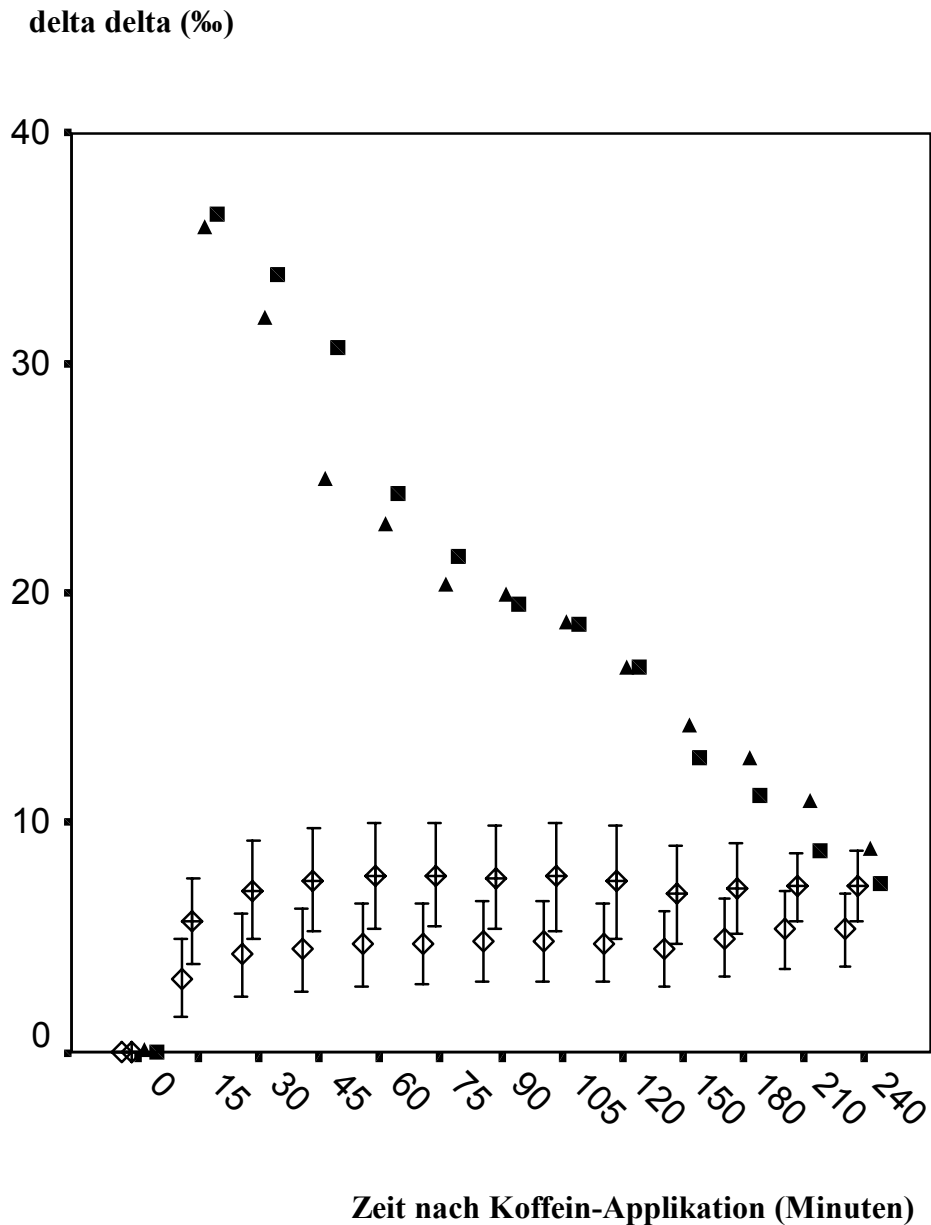


Abbildung 5: Anstieg von $^{13}\text{CO}_2$ in Ausatemproben nach der Applikation von ^{13}C -Koffein, dargestellt als delta-delta-Werte (gemessene Promille-Differenzen zu einem Standard-Gasgemisch abzüglich der Ausgangswerte): Ergebnisse der Untersuchungen im Herbst 2000 von Person 1 (schwarze Dreiecke) und Person 2 (schwarze Quadrate), sowie die der Nichtraucher ($n=30$, weiße Rauten) und der starken Raucher ($n=20$, weiße Rauten mit Kreuz), jeweils als Mittelwert und Standardabweichung. Person 3 ist nicht dargestellt, da die Werte nahe an den Mittelwerten der Raucher lagen. Zu beachten sind die unterschiedlichen Zeitskalen (nach 120 Minuten erfolgen die Messungen nur alle 30 Minuten).

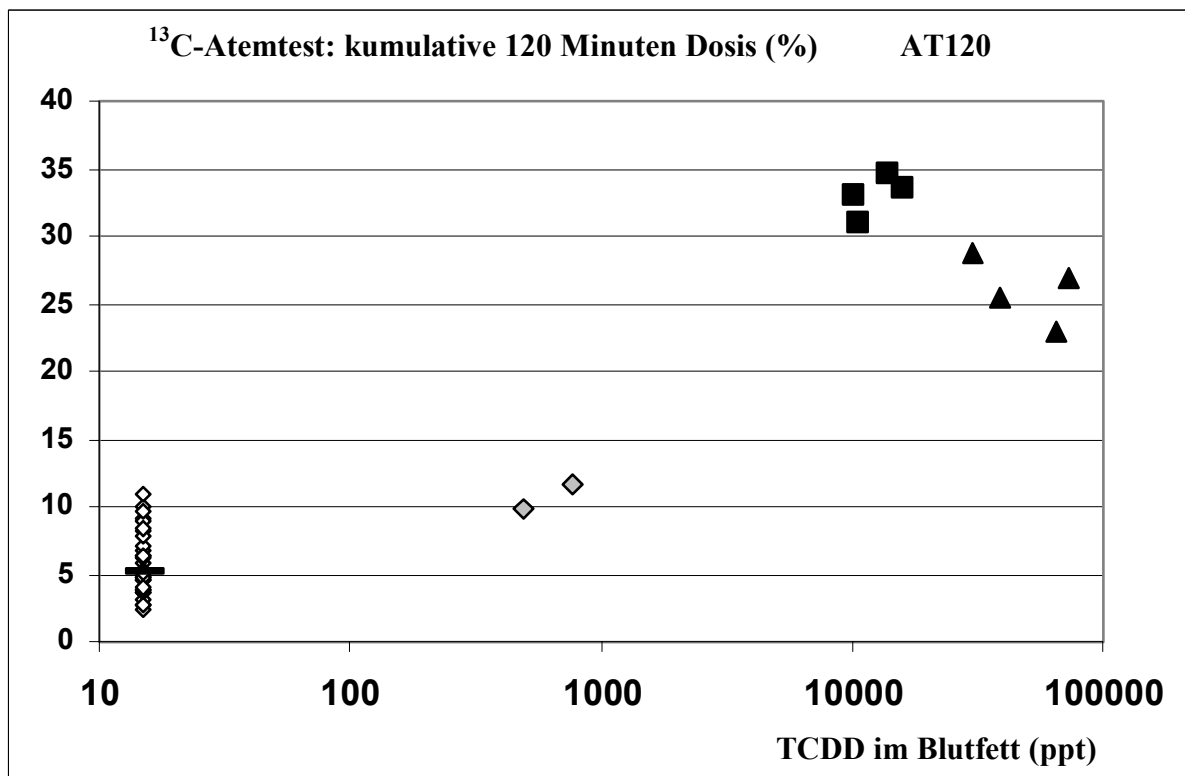


Abbildung 6: Kumulative 120 Minuten % Dosis im ^{13}C -Atemtest (AT120), dargestellt in Abhängigkeit von den jeweils gemessenen TCDD-Konzentrationen (logarithmische Achse) für die je vier Messungen bei Person 1 (schwarze Dreiecke) und Person 2 (schwarze Quadrate) und die beiden Messungen bei Person 3 (graue Rauten). Zusätzlich sind Einzelwerte der Nichtraucher dargestellt, (n=30, einschließlich Median-Wert als “-”), mit einer angenommenen PCDD/PCDF-Konzentration im Blutfett von 15 ppt (PÄPKE 1998).

Tabelle 3: Spearman Rang-Korrelations-Koeffizienten für 10 Parameter der Koffein-Demethylierung (n=50, TCDD-exponierte Personen nicht eingeschlossen). Werte $\geq 0,7$ sind fett markiert, soweit sie verschiedene Testprinzipien betreffen). Zusätzlich sind die Spearman Rang-Korrelations-Koeffizienten für die Korrelation der 10 Parameter mit der Anzahl der pro Tag gerauchten Zigaretten angegeben (Nichtraucher eingeschlossen).

Parameter	Abkürz.	AT 15	AT 120	AT 240	SMR 30	SMR 120	SMR 240	CL	UMR 1	UMR 2	UMR 3	Zig. Pro Tag
AT: Kumulative 15 min % Dosis	AT15											0,60
AT: Kumulative 120 min % Dosis	AT120	0,94										0,62
AT: Kumulative 240 min % Dosis	AT240	0,89	0,97									0,63
SMR 17X/137X (30 min)	SMR30	0,55	0,56	0,55								0,53
SMR 17X/137X (120 min)	SMR120	0,68	0,71	0,69	0,85							0,59
SMR 17X/137X (240 min)	SMR240	0,70	0,69	0,67	0,71	0,89						0,57
Gesamt-Clearance/kg Körpergew.	CL	0,82	0,82	0,80	0,59	0,70	0,63					0,69
UMR: (AFMU+1U+1X)/17U	UMR1	0,53	0,56	0,57	0,61	0,55	0,41 ^a	0,62				0,56
UMR: (17X+17U)/137X	UMR2	0,64	0,67	0,65	0,43 ^a	0,50	0,49	0,61	0,17 ^c			0,34 ^b
UMR: 17X/137X	UMR3	0,56	0,61	0,60	0,42 ^a	0,46	0,50	0,56	0,28 ^c	0,89		0,34 ^b

^a p<0,01, ^b p<0,05, ^c nicht signifikant; alle anderen: p<0,001 oder p<0,0001

Tabelle 4: Ergebnisse für Parameter der Koffein-Demethylierung (Abkürzungen: siehe Tabelle 3), die mit verschiedenen Methoden gemessen wurde: bei 30 Nichtrauchern und 20 Rauchern (jeweils Mittelwert, MW; Standardabweichung; SD, Minimum, Min; Maximum, Max; 95 Perzentile), sowie bei den TCDD-exponierten Personen 1, 2 und 3 (Einzelmessungen zu verschiedenen Zeitpunkten).

Para- meter	Nichtraucher (NR, n=30)					Raucher (R, n=20)					Ratio MW (R: NR)	Person 1				Person 2				Person 3	
	MW	SD	Min	Max	95.P	MW	SD	Min.	Max.	95.P		12/98	3/99	3/00	10/00	12/98	3/99	3/00	10/00	3/99	10/00
AT15	0,28	0,15	0,06	0,67	0,59	0,51	0,17	0,21	0,85	0,85	1,82	2,00	1,64	2,42	2,82	3,08	2,65	1,88	3,12	0,51	0,42
AT120	5,89	2,36	2,31	10,85	9,97	9,61	2,49	4,67	15,61	15,49	1,63	23,0	26,9	25,5	28,7	34,7	33,7	31,0	33,1	11,7	9,8
AT240	12,90	4,52	4,93	22,89	19,28	19,68	4,64	9,08	30,72	30,48	1,53	33,0	38,3	38,3	44,6	49,0	47,4	46,5	48,5	23,2	21,6
SMR30	0,104	0,057	0,038	0,307	0,223	0,154	0,050	0,063	0,249	0,249	1,48	n.gem	1,30	1,24	1,00	n.gem	0,97	0,95	1,06	0,157	0,127
SMR120	0,236	0,09	0,076	0,454	0,439	0,384	0,128	0,141	0,66	0,654	1,63	n.gem	2,90	2,39	1,97	n.gem	2,21	2,56	2,25	0,447	0,320
SMR240	0,445	0,173	0,115	0,872	0,78	0,742	0,280	0,25	1,274	1,263	1,67	n.gem	2,17	2,92	3,51	n.gem	3,39	3,12	2,83	0,808	0,641
CL	0,071	0,023	0,031	0,136	0,117	0,118	0,028	0,067	0,170	0,170	1,66	n.gem	0,708	0,811	0,518	n.gem	0,538	0,560	0,625	0,069	0,074
UMR1	3,65	1,35	1,62	6,08	5,94	6,55	2,81	2,59	12,41	12,37	1,79	n.gem	39,3	38,2	24,2	n.gem	29,85	35,55	34,5	14,0	12,3
UMR2	3,96	2,76	0,80	13,40	10,81	5,77	3,19	0,70	11,90	11,81	1,46	n.gem	9,7	10,2	12,5	n.gem	5,66	6,95	7,44	3,90	0,83
UMR3	1,64	1,10	0,40	5,00	4,61	2,33	1,30	0,30	5,50	5,49	1,42	n.gem	2,79	3,96	2,43	n.gem	2,59	2,98	4,43	2,45	0,51

n.gem. = nicht gemessen

6. Diskussion

6.1. Immunsystem

Bei den immunologischen Untersuchungen konnte wie geplant ein umfangreiches Programm etabliert werden, bei dem wesentliche heute bekannte Funktionen einbezogen werden konnten, und bei dessen Umsetzung besonderer Wert auf die Konstanz der Bedingungen während der Untersuchungsphase gelegt wurde. Die Untersuchung einer gesunden, altersentsprechenden Kontrollgruppe unter gleichen Bedingungen und unter Berücksichtigung des Einflußfaktors "Rauchen" sollte eine Interpretation der erhobenen Daten erleichtern. Auf der anderen Seite ist zu bedenken, daß einzelne immunologische Befunde nicht überinterpretiert werden sollten (größere interindividuelle Variation als bei manchen anderen biologischen Parametern, nicht auszuschließende Tag-zu-Tag-Variationen bei komplexen Methoden). Zudem ist natürlich zu berücksichtigen, daß bei der geringen Zahl von 3 TCDD-exponierten Personen eine statistische Auswertung entfällt, und daß Person 1 mit der höchsten TCDD-Belastung durch die anhaltende Chorakne an einer chronischen Infektion der Haut leidet mit möglicher Einwirkung auf das Immunsystem, die eine Behandlung mit Medikamenten erforderlich macht, die wiederum das Immunsystem beeinflussen oder beeinflussen könnten. Unter Beachtung dieser Faktoren sollte dennoch eine aussagekräftige Interpretation möglich sein, handelt es sich doch um eine ausschließliche TCDD-Exposition mit Konzentrationen bei Person 1 und 2, die bei Erwachsenen nie in vergleichbarer Höhe gemessen wurden (mehr als 4 Zehnerpotenzen über der Hintergrund-Belastung). Eine "immuntoxische" Substanz sollte bei jedem einzelnen Belasteten Zeichen der Veränderung des Immunsystems hervorrufen.

Eine Interpretation der Ergebnisse kann mit zwei Aspekten stattfinden: 1.) liegt individuell eine überzufällige Häufung von außerhalb des "Normalbereichs" liegenden Werten vor ? (wenn ja: welche Parameter betreffend?), und 2.) gibt es gleichsinnige Normabweichungen bei den TCDD-exponierten Personen (insbesondere bei den hoch belasteten Personen 1 und 2: auffälliges Muster?) ?

Punkt 1: Bei den gemessenen 164 Parametern ergibt sich für jede immun-gesunde Person eine statistische Zufallserwartung, daß 16,4 Parameter (10 % der Werte) außerhalb des Bereichs zwischen der 5. und der 95. Perzentile ("Normalbereich") liegen. Person 3 mit moderater TCDD-Exposition war in dieser Hinsicht also nicht auffällig (17 Parameter, davon allein 7 eine relative hohe Lymphozyten-Proliferation nach Tetanus-Stimulation betreffend). Gleiches gilt für Person 2, die mit 23 Parametern zwar über der durchschnittlichen Erwartung lag, jedoch waren bei 7 Parametern die auffälligen Werte durch eine ungewöhnlich starke PBMC-Proliferation der Medium-Kontrolle nach 3 Tagen bedingt, die niedrige Stimulations-Indizes bei den Mitogenen und IL-2 führte nach sich zog. Da bei der Medium-Kontrolle nach 5 Tagen kein entsprechend hoher cpm-Wert gemessen wurde, ist ein Artefakt wahrscheinlich (z.B. durch Kontamination des Mediums durch ein Stimulans).

Bei Person 1 fanden sich 32 Parameter außerhalb des Normalbereichs, so daß bei ihr eine zufällige Häufung unwahrscheinlich ist. Bei den einzelnen untersuchten Funktionen fanden sich

Häufungen von auffälligen Werten über der Zufallserwartung von 10% beim Blutbild (3 von 12 Parametern: hohe Leukozytenzahl mit hoher Lymphozytenzahl und niedriger Basophilenzahl), bei der Zytokin-Produktion (4 von 13 Parametern: niedrige IL-5-Sekretion und niedrige intrazelluläre IL-4-Produktion), bei der Lymphozyten-Proliferation (13 von 80 Parametern: insbesondere hohe Proliferation nach Mitogen- und Candida-Stimulation), bei den Lymphozyten-Subpopulationen (10 von 54 Parametern: insbesondere hoher T-Zell-Anteil der Lymphozyten, niedriger Anteil von Zellen mit hoher CD29-Dichte auf CD8-Zellen, niedriger %-Anteil von kleinen Nk-Zell-Subpopulationen; 3 als absolute Zellzahl pro nl ausgewertete Parameter sind bedingt durch die hohe Lymphozytenzahl auffällig) und bei den spezifischen Impf-Antikörpern (1 von 2 Parametern: niedrige Tetanus-Antikörper trotz Auffrisch-Impfung ein Jahr zuvor; auch die Diphtherie-Antikörper lagen nur auf der 5. Perzentile). Zumindest ein Teil dieser Auffälligkeiten kann mit der Kortikosteroid-Behandlung in Verbindung gebracht werden (niedrigere Produktion von TH₂-Zytokinen, geringere Produktion von spezifischen Antikörpern), auch könnte die ablaufende Entzündungsreaktion zu einer unspezifischen Voraktivierung geführt haben mit gesteigerter Lymphozyten-Proliferation. Zudem sollte die hohe Lymphozytenzahl bei der Proliferation mit der Vollblut-Methode allgemein zu höheren cpm-Werten führen, da hierbei eine konstante Blutmenge von 12,5 µl pro well zum Einsatz kommt. Bezüglich dieses Punktes gilt gleiches für Person 2.

Punkt 2: Von den soeben beschriebenen auffälligen Parametern bei Person 1 wurden gleichsinnige Veränderungen bei den anderen beiden Wienern gefunden für die Lymphozytenzahl im peripheren Blut (nur bei Person 2), für die IL-5-Sekretion (nur Tag 1: bei der moderat exponierten Person 3, nicht jedoch bei der stark exponierten Person 2), für die Lymphozyten-Proliferation nach Mitogen- und Candida-Stimulation (z.T. bei Person 2 und 3) und für eine kleine Nk-Zell-Subpopulation (auch bei Person 2, nicht bei Person 3).

Die Impf-Reaktion nach Diphtherie-Boosterimpfung zeigte bei Person 2 eine im Streubereich des Kontroll-Kollektivs liegende Reaktion, während bei Person 1 kein Antikörper-Anstieg gemessen werden konnte und ihre Lymphozyten-Proliferation die schwächste aller untersuchten 16 Personen war. Dies ist u.U. auf die Immun-Suppression bei Kortikosteroid-Behandlung zurückzuführen und angesichts der unauffälligen Reaktion bei Person 2 eher nicht TCDD-bedingt. Gegen eine negativ durch TCDD beeinflusste Impfreaktion spricht auch die außergewöhnlich starke Lymphozyten-Proliferation nach Tetanus-Stimulation bei Person 3 (und teilweise auch bei Person 2).

Insgesamt bleiben als TCDD-verdächtige Effekte eine hohe Zahl von Lymphozyten im peripheren Blut, eine relativ starke Lymphozyten-Proliferation nach Mitogen- und Candida-Stimulation (bei der Vollblut-Methode möglicherweise auch Folge der hohen Lymphozytenzahl) und ein relativ niedriger prozentualer Anteil von Nk-Zell-Subpopulationen (CD56⁺CD16⁻ und CD56⁻CD16⁺) bei den Lymphozyten. Die üblicherweise als Nk-Zellen ausgewertete Lymphozyten-Fraktion (CD56/CD16⁺: mindestens ein positiver Marker auf CD3-negativen Zellen) lag bei den hoch TCDD-exponierten Personen 1 und 2 im unteren Normalbereich. Bei mehreren Voruntersuchungen im Rahmen der Routine-Diagnostik in Wien hatten sich bei ihnen z.T. Werte (CD3⁻CD56/CD16⁺ in % der Lymphozyten) unterhalb des Normalbereichs gezeigt (GEUSAU et al., 2001). Untersuchungen der Nk-Funktion (Lyse von K562-Zellen) in Berlin hatten dabei keinen Anhalt für eine verminderte Lyse-Fähigkeit ergeben (unpublizierte Daten).

Bei Untersuchungen nach dem Seveso-Unglück 1976 fanden sich bei exponierten Kindern mit Chloarakne im Vergleich zu Nicht-Exponierten ebenfalls höhere Proliferationsraten nach Lymphozyten-Stimulation mit PHA und PWM, die jedoch insgesamt alle innerhalb des Normalbereichs lagen (BERTAZZI et al., 1998; MOCARELLI et al., 1999; NEUBERT et al., 1999). Daten über die Höhe der TCDD-Exposition lagen nicht vor, die beobachteten Veränderungen könnten z.T. auch Chloarakne-assoziiert sein. Ebenfalls fand sich bei diesen Untersuchungen bei den exponierten Personen eine höhere Zahl von Lymphozyten im peripheren Blut (auch innerhalb des Normalbereichs), wie sie sich in dieser Studie auch bei Person 1 und 2 fand. Routine-Untersuchungen in Wien in den letzten Jahren hatten bei Person 1 überwiegend erhöhte Leukozyten-Werte ergeben (vermutlich bedingt durch Entzündung und Kortikosteroid-Behandlung), jedoch ohne erhöhten prozentualen Anteil von Lymphozyten (GEUSAU et al., 2001).

In Folgeuntersuchungen von ehemaligen Seveso-Kindern zeigte sich ein prolongierter Effekt der Tetanus-Impfung (NEUBERT et al., 1999), der möglicherweise der jetzt gemessenen relativ hohen Lymphozyten-Proliferation nach Tetanus-Stimulation bei Person 2 und 3 entspricht. Ebenfalls mit lange zurückliegender Exposition wurden in den letzten Jahren ehemalige Chemiewerker untersucht, die aktuell eine moderate TCDD-Exposition hatten mit Werten bis um 1000 ppt (z.B. ERNST et al., 1998; JUNG et al., 1998; NEUBERT et al., 1993, 1995, 2000; OTT et al., 1994; TONN et al., 1996). Bezüglich der in der vorliegenden Studie erhobenen Befunde fanden sich auch bei OTT et al. (1994) marginal erniedrigte Prozentsätze von Nk-Zellen, die jedoch nicht mit der TCDD-Exposition assoziiert waren, sondern mit dem Chloarakne-Status. Ein leichter Trend zu höheren Lymphozyten-Proliferationsraten mit steigender TCDD-Exposition fand sich in einer anderen Studie bei PHA-Stimulation, nicht aber bei Stimulation mit anderen Mitogenen (NEUBERT et al., 1995). Die von TONN et al. (1996) berichtete schwächere Lymphozyten-Proliferation nach IL-2-Stimulation konnte nicht bestätigt werden. Ein umfangreiches immunologisches Untersuchungsprogramm konnte keinen TCDD-Effekt bei exponierten Vietnam-Veteranen feststellen (MICHALEK et al., 1999). Bei all diesen Untersuchungen sind zahlreiche Confounder (Alter, Erkrankungen, Rauchen, Expositionsmuster) zu berücksichtigen, die eine Interpretation der Daten erschweren.

Unerwartet häufig fanden sich Unterschiede zwischen den Gruppen der Nichtraucher und der starken Raucher. Diese Befunde wurden teilweise bereits von anderen Arbeitsgruppen erhoben, so die bei Rauchern höhere Leukozyten-Zellzahl im peripheren Blut (z.B. FREEDMAN et al., 1996), und ein höherer T-Zell-Anteil bei den Lymphozyten mit höherer CD4/CD8-Ratio bedingt durch höhere CD4-Zellzahl (z.B. FREEDMAN et al., 1996; SCHABERG et al., 1997). Die Einbeziehung von Rauchern bei der vorliegenden Untersuchung erfüllte somit auch einen Sinn als Qualitätskontrolle für die durchgeführten Methoden. Bestätigt wurde somit, daß das Immunsystem sehr wohl bereits durch Umweltfaktoren wie das Zigaretten-Rauchen zu beeinflussen ist. Im Falle der höheren Lymphozyten-Proliferation im Vollblut nach Candida-Stimulation lagen die im Vergleich zu anderen Nichtrauchern erhöhten Werte der TCDD-exponierten Personen sogar innerhalb des "Normalbereichs" der Raucher. Dies zeigt eindrücklich, daß auch bei immunologischen Studien das Zigaretten-Rauchen als starker Confounder zu berücksichtigen ist.

Insgesamt zeigte die umfangreiche Untersuchung wesentlicher Teile des Immunsystems trotz der extremen TCDD-Exposition bei den Personen 1 und 2 keine eindeutigen Auffälligkeiten, die auf diese Exposition zurückgeführt werden könnten. Bei Einbeziehung von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen sind möglicherweise die relativ hohe Lymphozytenzahl im peripheren Blut, der relativ niedrige prozentuale Nk-Zell-Anteil bei den Lymphozyten und die erhöhte Lymphozyten-Proliferation nach Mitogen- und Candida-Stimulation als TCDD-Effekte anzusehen (eindeutige Aussage wären nur bei Untersuchung einer größeren Zahl von hoch exponierten Personen möglich). Diese Veränderungen waren jedoch nicht gravierend und lagen im Fall der Candida-Stimulation innerhalb des "Normalbereichs" von Rauchern. Die beobachteten leichten Veränderungen haben sehr wahrscheinlich keine klinische Relevanz, wie auch die bisherige Nachbeobachtung der TCDD-exponierten Personen keinen Anhalt für eine Beeinträchtigung ihres Immunsystems bot. Es bestätigt sich somit erneut, daß immunologische Parameter nicht als empfindliche Biomarker einer TCDD-Exposition angesehen werden können. Für den Hintergrundbereich kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Wirkung der hier vorliegenden Dioxin-Exposition (einschließlich anderer POP-Verbindungen mit Affinität zum Ah-Rezeptor) auf das Immunsystem des Erwachsenen Menschen ausgeschlossen werden.

6.2. Cytochrom P450-Aktivität der Leber (CYP1A2)

Bei den TCDD-exponierten Personen 1, 2 und 3 wurde die CYP1A2-Aktivität in der Leber indirekt über verschiedene Methoden zur Bestimmung der Demethylierungs-Rate von Koffein gemessen. Die Messungen erfolgten parallel dazu an einer Gruppe von Nichtraucher und Rauchern, bei denen die bekannte Dosis-abhängige Induktion durch Zigarettenrauch bestätigt wurde (z.B. VESTISEN et al., 1992). Dabei zeigten nicht alle der 10 ausgewerteten Parameter gleich gute Ergebnisse: insbesondere für UMR2 und UMR3 war der Effekt deutlich schwächer ausgeprägt, wenn auch noch signifikant. Die Ergebnisse von Nichtrauchern und Rauchern überlappten sich, so daß keiner der Parameter in der Lage war, individuell zwischen Nichtraucher und starkem Raucher zu differenzieren. Für die relativ kleinen Untergruppen von Rauchern mit oder ohne Filterbenutzung (jeweils n=10) konnte kein signifikanter Unterschied bei den verschiedenen Methoden festgestellt werden. Somit konnte eine CYP1A2-Induktionsvermindernde Wirkung bei Rauchern durch die Filterbenutzung nicht bestätigt werden (These aus Promotionsschrift von SCHUMACHER, 1995).

Bei den hoch TCDD-exponierten Personen 1 und 2 zeigte sich eine deutliche Induktion, die weit über die durch starkes Zigarettenrauchen ausgelöste hinausging, bei acht der zehn ausgewerteten Parameter (nicht für UMR2 und UMR3). Gegenüber dem Mittelwert von nicht exponierten Nichtrauchern waren bei beiden Personen diese indirekten Parameter der CYP1A2-Aktivität bis zu einer Zehnerpotenz erhöht. Dies entspricht vermutlich einer Erhöhung der CYP1A2-Proteinmasse in der Leber wenigstens in der gleichen Größenordnung (denkbar ist auch eine noch stärkere Zunahme der Proteinmasse, die durch die indirekte Meßtechnik nicht quantitativ in gleichem Verhältnis erfaßt wird). Beim Atemtest kam es aufgrund der starken Induktion bei Person 1 und 2 bereits nach 15 Minuten zu maximalen delta-delta-Werten (Abbildung 5), so daß die kumulative Dosis AT15 den deutlichsten Effekt gegenüber Nichtrauchern ergab. Dies macht deutlich, daß bei Gabe eines Koffein-Bolus bei kumulativer Erfassung der Stoffwechsel-

Leistung mit zunehmender Zeitspanne die Ergebnisse von induzierten Personen zunehmend "verwischt" werden (nach z.B. 24 Stunden haben alle das Koffein mehr oder weniger vollständig metabolisiert; auch zwischen Nichtrauchern und Rauchern fanden sich die höchsten Unterschiede in den Mittelwerten nach 15 Minuten). Somit ist der üblicherweise verwendete AT120-Wert für Untersuchungen an hoch TCDD-Exponierten nicht optimal. Die gemessenen Werte waren teilweise bei Person 2 höher als bei Person 1, trotz der deutlich höheren TCDD-Werte bei Person 1. Dies mag durch interindividuelle Variation zu erklären sein, jedoch kann auch eine Hemmung der Induktion durch die Einnahme von Medikamenten und/oder die chronische Infektion der Haut nicht ausgeschlossen werden. Innerhalb des Zeitraums von fast zwei Jahren waren die Ergebnisse bei beiden Personen gut reproduzierbar und zeigten keine fallende Tendenz trotz fallender TCDD-Konzentrationen. Dies entspricht vermutlich einer lang anhaltenden maximalen CYP1A2-Induktion auf einem Plateau.

Bei der moderat TCDD-exponierten Person 3 (männliches Geschlecht) sind die Ergebnisse für die ausgewerteten Parameter nicht konsistent. Beim Atemtest fanden sich die Werte für AT120 und AT240 nahe der 95. Perzentile von Nichtrauchern. An dieser Feststellung ändert sich auch nichts, wenn nur die männlichen Nichtraucher (n=15, höhere Werte beim Atemtest als Frauen) zum Vergleich herangezogen werden (95. Perzentile 10,9 und 22,9 % für AT120 beziehungsweise AT240). Bei UMR1 fand sich für Person 3 sogar ein Wert deutlich oberhalb der 95. Perzentile von Nichtrauchern. Im Gegensatz hierzu waren die aus Serum-Bestimmungen ermittelten Parameter (SMR30, SMR120, SMR240, CL) nicht auffällig different von Mittelwerten bei Nichtrauchern. Dabei zeigte gerade die Clearance (CL) die beste Korrelation mit der Anzahl der gerauchten Zigaretten und wird von einigen Autoren als "Goldstandard" der Koffein-Demethylierung angesehen. Diese reproduzierbar gemessenen Diskrepanzen sind zur Zeit nicht erklärbar und verlangen eine zurückhaltende Interpretation der Ergebnisse von Person 3. Theoretisch kann eine genetisch determinierte Abweichung von üblichen Metabolisierungswegen bei dieser Person nicht ausgeschlossen werden.

Zusammenfassend kann über die verwendeten Methoden gesagt werden, daß acht der zehn ausgewerteten Parameter der CYP1A2-Aktivität in der Leber (nicht UMR2 und UMR3) die hohe TCDD-Exposition von Person 1 und 2 individuell als Biomarker erfassen konnten und für epidemiologische Studien geeignet sind. Von diesen Parametern maßen AT15, SMR30 und SMR120, CL sowie UMR1 einen wenigstens 8-fachen und gut reproduzierbaren Anstieg gegenüber Mittelwerten von Nichtrauchern. Dabei haben der Atemtest und Messungen von Koffein-Metaboliten im Urin den Vorteil, nicht invasiv zu sein. Die genannten Methoden sind alle weitgehend unabhängig vom Untersucher, so daß eine Vergleichbarkeit verschiedener Studien gegeben sein sollte. Im Gegensatz hierzu zeigte sich bei UMR2 und UMR3 (beide Ratios mit Koffein im Nenner), daß diese Parameter offensichtlich nicht die CYP1A2-Aktivität der Leber widerspiegeln, wenn auch ein geringer Einfluß durch Zigarettenrauchen gemessen werden konnte. Diese Ergebnisse entsprechen einer neueren Untersuchung von SINUÉS et al. (1999) an Nichtrauchern und Rauchern, die ebenfalls UMR1 als verlässlichsten von insgesamt 5 untersuchten Urin-Metaboliten-Ratios ermittelten. Als eine mögliche Ursache konnte von dieser Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß UMR1 im Gegensatz zu den anderen Ratios weitgehend unabhängig vom Urinfluß ist.

Die hier vorgelegten Untersuchungen sind die ersten, die beim Menschen in-vivo eine Induktion der CYP1A2-Aktivität in der Leber durch TCDD dokumentieren. Untersuchungen an anderen TCDD-exponierten Personen konnten eine solche Induktion nicht nachweisen. Sechzehn bis 18 Jahre nach dem Seveso-Unfall wurde im Koffein-Atemtest (AT120) keine signifikante Differenz zwischen einer Gruppe von 10 exponierten Personen (TCDD Konzentrationen 1976 bis zu 6300 ppt) und 20 Kontrollpersonen gemessen. Leider lagen keine TCDD-Bestimmungen für den Zeitpunkt der Untersuchung vor (LAMBERT et al., 1993; BRAMBILLA et al., 1995). Bei 58 ehemaligen Chemikern, die 15 bis 37 Jahre vor der Untersuchung gegenüber TCDD exponiert waren, konnte kein signifikanter Effekt auf UMR1 festgestellt werden, trotz relativ hoher aktueller TCDD-Werte im Blutfett (Mittelwert 157 ppt, zwei Personen oberhalb 1000 ppt, Maximum 1742 ppt) (HALPARIN et al., 1995).

Bezüglich der Exposition gegenüber anderen persistenten organischen Verbindungen mit Affinität zum Ah-Rezeptor liegen Humandaten für Yu-Cheng-Patienten vor, die 1979 auf Taiwan stark mit PCDFs und PCBs kontaminiert wurden. Für den Koffein-Atemtest wurde eine Korrelation der Ergebnisse mit PCDF- und PCB-Konzentrationen im Blutfett berichtet. Der höchste gemessene Einzelwert betrug 23,6 % für AT120 (LAMBERT et al., 1993, 1994) und war somit vergleichbar den Ergebnissen bei Person 1, er war jedoch niedriger als bei Person 2. Bei der sogenannten Michigan-Kohorte von 51 Personen, die 1973/74 gegenüber polybromierten Biphenylen (PBBs) exponiert wurde, konnten signifikant höhere Ergebnisse bei exponierten im Vergleich zu nicht-exponierten Nichtrauchern für den Koffein-Atemtest (AT120) und UMR1 festgestellt werden. Die Median-Werte der Nichtraucher in der Kohorte waren jedoch niedriger als die von nicht PBB-exponierten Rauchern (LAMBERT et al., 1990). Bei den beiden letztgenannten Studien ist ein Vergleich mit den Ergebnissen der hier vorgelegten Untersuchungen auf der Basis von Toxizitäts-Äquivalenten (TEQ) im Blutfett nicht möglich. Bei der Benutzung von in-vitro Techniken (Hepatozyten-Kulturen) konnte grundsätzlich die Induzierbarkeit von CYP1A2 in der menschlichen Leber durch TCDD gezeigt werden (SCHRENK et al., 1995).

Tierexperimentell konnte insbesondere bei Nagetieren eine Dosis-abhängige Induktion der hepatischen CYP1-Aktivität nach TCDD-Behandlung gezeigt werden, so für die Ethoxy-Resorufin-O-Deethylase (EROD)-Aktivität, die spezifisch für CYP1A2 und stark mit der 3N-Demethylierung von Koffein in menschlicher Leber korreliert ist (BERTHOU et al., 1989). Bei Ratten konnte bei direkter Messung ein bis 100-facher Anstieg der EROD-Aktivität beobachtet werden, mit Plateau ab Dosen von 3 µg/kg Körpergewicht (ABRAHAM et al., 1988; SCHULZ-SCHALGE et al., 1991). Beim Marmoset-Affen (*Callithrix jacchus*, eine nicht-humane Primaten-Spezies) wurde ein maximaler Anstieg nur um das ca. 10-fache bei direkter Messung als EROD-Aktivität berichtet, und nur um das ca. 4-fache bei Anwendung des ¹⁴C-Koffein-Atemtests (KRÜGER et al., 1990), mit Erreichen eines Plateaus mit einer TCDD-Dosis von ca. 1 µg/kg Körpergewicht (SCHULZ-SCHALGE et al., 1992). Für Marmoset-Affen wurde ein Lowest Observable Effect Level (LOEL) von 3 ng TCDD pro kg Körpergewicht ermittelt (KRÜGER et al., 1990), vergleichbar dem von Ratten (ABRAHAM et al., 1988).

Bezüglich des möglichen Ausmaßes einer CYP1A2-Induktion in der Leber scheinen Marmoset Affen und Menschen vergleichbar zu sein (eine Zehnerpotenz, niedriger als bei Nagetieren), jedoch ist bei Menschen offensichtlich eine viel höhere TCDD-Dosis als 3 ng/kg Körpergewicht

erforderlich, um einen Effekt auszulösen. Dabei dürfte der im Vergleich zum Marmoset-Affen deutlich höhere prozentuale Fettanteil eine wichtige Rolle spielen, der nach Exposition zu niedrigeren Konzentrationen in der Leber führt. Weitere Nachuntersuchungen der Personen 1, 2 und 3 (mit abfallenden TCDD-Konzentrationen) werden Erkenntnisse über individuelle Verläufe der Konzentrations-Induktions-Kurven für die CYP1A2-Aktivität beim Menschen bringen.

Welche Bedeutung eine erhöhte CYP1A2-Aktivität für den Menschen hat, kann nicht eindeutig beantwortet werden. Hohe Aktivität der Cytochrom P450-Enzyme 1A1, 1A2 oder 1B1, die alle polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe und heterozyklische Amine bioaktivieren, führt in zahlreichen biochemischen in-vitro Testsystemen (z.B. Ames Test) zu steigender Mutagenität. Für den Menschen konnte eine Assoziation zwischen Aktivität von CYP1A1 und dem Lungenkrebs-Risiko gezeigt werden (KELLERMANN et al., 1973), sowie zwischen der Aktivität von CYP1A2 und dem Kolonkarzinom-Risiko (LANG et al., 1994). Das karzinogene Potential von TCDD wird weiterhin wissenschaftlich sehr unterschiedlich eingeschätzt (z.B. KAISER 2000), epidemiologische Studien konnten höchstens ein leicht ansteigendes Krebs-Risiko nachweisen. So zeigte sich bei Chemikern, die jedoch auch weiteren Substanzen gegenüber exponiert waren, eine "limited evidence" für die Karzinogenität von TCDD, mit einem relativen Risiko von 1,4 für alle Krebsarten (IARC 1997).

Zusammenfassend läßt sich für die CYP1A2-Aktivität der Leber sagen, daß diese zuverlässig und mit guter Reproduzierbarkeit durch mehrere Methoden als Koffein-Demethylierungsrate gemessen werden konnte (AT, SMR, CL und UMR1), während sich die ebenfalls untersuchten UMR2 und UMR3 (beide mit der Koffein-Konzentration im Nenner) als weniger brauchbar herausstellten. Bei den hoch TCDD-belasteten Personen 1 und 2 konnte eine ca. 10-fache Induktion nachgewiesen werden, die trotz fallender TCDD-Werte relativ konstant blieb und vermutlich einem Plateau in diesem Konzentrationsbereich entspricht. Weniger eindeutig waren die Ergebnisse der moderat exponierten Person 3, bei der sich reproduzierbar nur für zwei der verwendeten Methoden (AT, UMR1) eine Induktion im Vergleich zu Nichtrauchern nachweisen ließ. Möglicherweise liegt bei dieser Person eine Abweichung von üblichen Metabolisierungswegen vor. Die Annahme einer im Bereich von 1000 ppt noch nicht sicher vorliegenden Induktion wäre vereinbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Unter der Annahme, daß neben der CYP-Induktion auch weitere im Tierexperiment zu beobachtende TCDD-Effekte Ah-Rezeptor-vermittelt sind und so Wirkungen im extrem niedrigen Konzentrationsbereich erklären, würde eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Menschen dessen relative TCDD-Unempfindlichkeit erklären. Bemerkenswert bleibt somit weiterhin, daß bei empfindlichen Menschen schon TCDD-Konzentrationen um 1000 ppt im Blutfett klinische Symptome in Form von Choleknie auslösen können (NEEDHAM et al., 1997/98; SWEENEY et al., 1997/98; COENRAADS et al., 1999), während bisher kein Biomarker entdeckt worden ist, der in diesem Konzentrationsbereich individuell eine TCDD-Exposition sicher erkennen könnte. Wie für die Immunologie kann für den Hintergrundbereich eine relevante CYP1A2-Induktion in der Humanleber ausgeschlossen werden.

7. Literatur

- ABRAHAM K, KROWKE R, NEUBERT D (1988) Pharmacokinetics and biological activity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: 1. Dose-dependent tissue distribution and induction of hepatic ethoxyresorufin O-deethylase in rats following a single injection. *Arch Toxicol* **62**:359-368
- BERTAZZI PA, BERNUCCI I, BRAMBILLA G, CONSONNI D, PESATORI AC (1998) The Seveso studies on early and long-term effects of Dioxin exposure: a review. *Environ Health Perspect* **106**:626-633
- BERTHOU F, RATANASAVANH D, RICHE C, PICART D, VOIRIN T, GUILLOUZO A (1989) Comparison of caffeine metabolism by slices, microsomes and hepatocyte cultures from adult human liver. *Xenobiotica* **19**:401-417
- BRAMBILLA P, LAMBERT GH, CAZZANIGA M, NEEDHAM LL, FERRARI E, PATTERSON DG, GERTHOUX P, SIGNORINI S, MOCARELLI P (1995) Caffeine breath tests in subjects exposed to dioxin at Seveso: preliminary results. *Clin Chem* **41**:1926-1927
- BUTLER MA, IWASAKI M, GUENGERICH FP, KADLUBAR FF (1989) Human cytochrome P-450A (P-450IA2), the phenacetin O-deethylase, is primarily responsible for the hepatic 3-demethylation of caffeine and N-oxidation of carcinogenic arylamines. *Proc Natl Acad Sci* **86**:7696-7700
- CAMPBELL ME, SPIELBERG SP, KALOW W (1987) A urinary metabolic ratio that reflects systemic caffeine clearance. *Clin Pharmacol Ther* **42**:157-165
- COENRAADS PJ, OLIE K, TANG NJ (1999) Blood lipid concentration of dioxins and dibenzofurans causing chloracne. *Br J Dermatol* **141**:694-697
- ERNST M, FLESCH-JANY S, MORGENSTERN I, MANZ A (1998) Immune cell functions in industrial workers after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin: Dissociation of antigen-specific T-cell responses in cultures of diluted whole blood and of isolated peripheral blood mononuclear cells. *Environ Health Perspect* **106** (Suppl 2):701-705
- FREEDMAN DS, FLANDERS WD, BARBORIAK JJ, MALARCHER AM, GATES L (1996) Cigarette smoking and leukocyte subpopulations in men. *Ann Epidemiol* **6**:299-306
- GEUSAU A, ABRAHAM K, GEISSLER K, SATOR MO, STINGL G, TSCHACHLER E (2001) Severe 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) intoxication: clinical and laboratory effects. *Environ Health Perspect* **109**:865-869
- GEUSAU A, JURECKA W, NAHAVANDI H, SCHMIDT JB, STINGL G, TSCHACHLER E (2000) Punctate keratoderma-like lesions on the palms and soles in a patient with

- chloracne: a new clinical manifestation of dioxin intoxication? *Br J Dermatol* **143**:1067-1071
- GEUSAU A, TSCHACHLER E, MEIXNER M, SANDERMANN S, PÄPKE O, WOLF C, VALIC E, STINGL G, MCLACHLAN M (1999) Olestra increases faecal excretion of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Lancet* **354**:1266-1267
- GRANT DM, TANG BK, KALOW W (1984) A simple test for acetylator phenotype using caffeine. *Br J Clin Pharmacol* **17**:459-464
- HALPARIN W, KALOW W, SWEENEY MH, TANG BK, FINGERHUT M, TIMPKINS B, WILLE K (1995) Induction of P-450 in workers exposed to dioxin. *Occupat Environ Med* **52**:86-91
- IARC (1997) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 69: Polychlorinated dibenzo-para-dioxins and polychlorinated dibenzofurans. IARC, Lyon
- JUNG D, BERG PA, EDLER L, EHRENTAL W, FENNER D, FLESCHE-JANYS D, HUBER C, KLEIN R, KOITKA C, LUCIER G, MANZ A, MUTTRAY A, NEEDHAM LL, PÄPKE O, PIETSCH M, PORTIER C, PATTERSON D, PRELLWITZ W, ROSE DM, THEWS A, KONIETZKO J (1998) Immunologic findings in workers formerly exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and its congeners. *Environ Health Perspect* **106** (Suppl 2):689-695
- KADLUBAR FF, YOUNG JF, LANG NP, CAPORASO NE, SINHA R, LANDI MT (1996). Correspondence re: letter to the editor by BK Tang and W Kalow on CYP1A2 phenotyping using caffeine. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**: 231, 1996. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**:757-8
- KAISER J (2000). Just how bad is dioxin. *Science* **288**:1941-1944
- KALOW W, TANG BK (1991) Use of caffeine metabolite ratios to explore CYP1A2 and xanthine oxidase activities. *Clin Pharmacol Ther* **50**:508-518
- KELLERMANN G, SHAW CR, LUYTEN-KELLERMAN M (1973) Aryl hydrocarbon hydroxylase inducibility and bronchogenic carcinoma. *N Engl J Med* **289**:934-937
- KOTAKE AN, SCHOELLER DA, LAMBERT GH, BAKER AL, SCHAFFER DD, JOSEPHS H (1982) The caffeine CO₂ breath test: dose response and route of N-demethylation in smokers and nonsmokers. *Clin Pharmacol Ther* **32**:261-9
- KRÜGER N, NEUBERT B, HELGE H, NEUBERT D (1990) Induction of caffeine-demethylations by 2,3,7,8-TCDD in marmoset monkeys measured with a ¹⁴CO₂ breath-test. *Chemosphere* **20**:1173-1176
- LAMBERT GH, SCHOELLER DA, HUMPHREY HEB, KOTAKE AN, LIETZ H, CAMPBELL M, KALOW W, SPIELBERG SP, BUDD M (1990) The caffeine breath

- test and caffeine urinary metabolite ratios in the Michigan cohort exposed to polybrominated biphenyls: a preliminary study. *Environ Health Perspect* **89**:175-181
- LAMBERT GH, HSU CC, GUO L, RYAN JJ, SCHOELLER DA (1994) The dose response relationship between the serum levels of polychlorinated biphenyls (PCBs) and polychlorinated dibenzofurans (PCDFs) and cytochrome P4501A2 activity as determined by the caffeine breath test. *Organohalogen Compounds* **21**:485-488
- LAMBERT GH, MOCARELLI P, HSU CC, NEEDHAM LL, RYAN JJ, GUO L, BRAMBILLA P, SIGNORINI S, PATTERSON DG, LAI TJ, GARCIA F, FERRARI E, SCHOELLER, DA (1993) Cytochrome P4501A2 activity in dioxin exposed Seveso subjects as compared to polychlorinated biphenyl and polychlorinated dibenzofuran exposed Yucheng subjects. *Organohalogen Compounds* **14**:253-256
- LANG NP, BUTLER MA, MASSENGILL J, LAWSON M, STOTTS RC, HAUER-JENSEN M, KADLUBAR FF (1994) Rapid metabolic phenotypes for acetyltransferase and cytochrome P4501A2 and putative exposure to food-borne heterocyclic amines increase the risk for colorectal cancer or polyps. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **3**:675-82
- MICHALEK JE, KETCHUM NS, CHECK IJ (1999) Serum dioxin and immunologic response in veterans of Operation Ranch Hand. *Am J Epidemiol* **149**:1038-1046
- MOCARELLI P, GERTHOUX PM, BRAMBILLA P, MAROCCHI A, BERETTA C, BERTONA M, CAZZANIGA M, COLOMBO L, CRESPI C, FERRARI E, LIMONTA G, SARTO C, SIGNORINI S, TRAMACERE PL (1999) Dioxin health effects on humans twenty years after Seveso: a summary. In: *The Seveso accident 20 years on* (Ballarin-Denti A, Bertazzi PA, Facchetti S, Mocarelli P, eds) Elsevier, New York, 41-51
- NEEDHAM LL, GERTHOUX PM, PATTERSON DG, BRAMBILLA P, TURNER WE, BERETTA C, PIRKLE JL, COLOMBO L, SAMPSON EJ, TRAMACERE PL, SIGNORINI S, MEAZZA L, CARRERI V, JACKSON RJ, MOCARELLI P (1997/98) Serum dioxin levels in seveso, Italy, population in 1976. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* **17**:225-240
- NEUBERT R, MASKOW L, WEBB J, JACOB-MÜLLER U, NOGUEIRA AC, DELGADO I, HELGE H, NEUBERT D (1993) Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 1. Blood cell receptors in volunteers with moderately increased body burdens. *Life Sciences* **53**:1995-2006
- NEUBERT R, MASKOW L, WEBB J, DELGADO I, HELGE H, NEUBERT D (1995) Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 2. In vitro proliferation of lymphocytes from workers with quantified moderately-increased body burdens. *Life Sciences* **56**:421-436
- NEUBERT R, BRAMBILLA P, GERTHOUX PM, MOCARELLI P, NEUBERT D (1999) Relevant data as well as limitations for assessing possible effects of polyhalogenated

- dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans on the human immune system. In: The Seveso accident 20 years on (Ballarin-Denti A, Bertazzi PA, Facchetti S, Mocarelli P, eds). Elsevier, New York, 99-123
- NEUBERT R, MASKOW L, TRIEBIG G, BRODING HC, JACOB-MÜLLER U, HELGE H, NEUBERT D (2000) Chlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans and the human immune system. 3. Plasma immunoglobulins and cytokines of workers with quantified moderately-increased body burdens. *Life Sciences* **66**:2123-2142
- OTT MG, ZOBEL A, GERMAN C (1994) Laboratory results for selected target organs in 138 individuals occupationally exposed to TCDD. *Chemosphere* **29**:2423-2437
- PÄPKE O, BALL M, LIS A, SCHEUNERT K (1989) PCDD/PCDFs in whole blood samples of unexposed persons. *Chemosphere* **19**:941-948
- PÄPKE O (1997) PCDDs/Fs in human blood, a fast and sensitive method. *Organohalogen Compounds* **31**:212-214
- PÄPKE O (1998) PCDD/PCDF: Human background data for Germany, a 10-year experience. *Environ Health Perspect* **106** (Suppl 2):723-731
- POELLINGER L (2000) Mechanistic aspects – the dioxin (aryl hydrocarbon) receptor. *Food Add Contam* **17**:261-266
- RENNER E, WIETHOLTZ H, HUGUENIN P, ARNAUD MJ, PREISIG R (1984) Caffeine: a model compound for measuring liver function. *Hepatology* **4**:38-46
- ROST KL, BRÖSICKE H, BROCKMÖLLER J, SCHEFFLER M, HELGE H, ROOTS I (1992) Increase of cytochrome P450IA2 activity by omeprazole: Evidence by the ¹³C-[N-3-methyl]-caffeine breath test in poor and extensive metabolizers of S-mephenytoin. *Clin Pharmacol Ther* **52**:170-180
- ROSTAMI-HODJEGAN A, NURMINEN S, JACKSON PR, TUCKER GT (1996) Caffeine urinary metabolite ratios as markers of enzyme activity: a theoretical assessment. *Pharmacogenetics* **6**:121-49
- SCHABERG T, THEILACKER C, NITSCHKE OT, LODE H (1997) Lymphocyte subsets in peripheral blood and smoking habits. *Lung* **175**:387-394
- SCHRENK D, STUVEN T, GOHL G, VIEBAHN R, BOCK KW (1995) Induction of CYP1A and glutathione S-transferase activity by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in human hepatocyte cultures. *Carcinogenesis* **16**:943-949
- SCHULZ-SCHALGE T, GOLOR G, STAHLMANN R (1992) Biological effect of high doses of TCDD in the marmoset monkey, *Callithrix jacchus*. Plateau of ethoxyresorufin O-deethylase activity in liver microsomes. *Chemosphere* **25**:991-995

- SCHULZ-SCHALGE T, KOCH E, GOLOR G, WIESMÜLLER T, HAGENMAIER H, NEUBERT D (1991) Comparison of the induction of cytochrome P450 and ethoxyresorufin O-deethylase by a single subcutaneous administration of TCDD in liver microsomes of marmoset monkeys (*Callithrix jacchus*) and rats. *Chemosphere* **23**:1933-1939
- SCHUMACHER G (1995) Der 13C-Coffein-Atemtest zur Prüfung der Induktion von Cytochrom-P450IA2 bei Rauchern und Nichtrauchern, Freie Universität Berlin, Promotionsschrift
- SINUÉS B, SÁENZ MA, LANUZA J, BERNAL ML, FANLO A, JUSTE JL, MAYAYO E (1999) Five caffeine metabolite Ratios to measure tobacco-induced CYP1A2 activity and their relationships with urinary mutagenicity and urine flow. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **8**:159-166
- SWEENEY MH, CALVERT GM, EGELAND GA, FINGERHUT MA, HALPERIN WE, PIACITELLI LA (1997/98) Review and update of the results of the NIOSH medical study of workers exposed to chemicals contaminated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin. *Teratogenesis Carcinog Mutagen* **17**:241-247
- TANG BK, ZHOU Y, KADAR D, KALOW W (1994) Caffeine as a probe for CYP1A2 activity: potential influence of renal factors on urinary phenotypic trait measurements. *Pharmacogenetics* **4**:117-24
- TONN T, ESSER C, SCHNEIDER EM, STEINMANN-STEINER-HALDENSTÄDT W, GLEICHMANN E (1996) Persistence of decreased T-helper cell function in industrial workers 20 years after exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Environ Health Perspect* **104**: 422-426
- VESTISEN K, POULSEN HE, LOFT S (1992) Foreign compound metabolism capacity in man measured from metabolites of dietary caffeine. *Carcinogenesis* **13**:1561-1568

8. Verwendete Abkürzungen

AFMU	5-Acetylamino-6-Formylamino-3-Methyluracil
AT	Atemtest
CL	Clearance
cpm	counts per minute
CYP	Cytochrom P450
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Lf	Letalitätsfaktor
Nk	Natural killer
PBMCs	Peripheral Blood Mononuclear Cells (Lymphozyten und Monozyten)
PCBs	polychlorierte Biphenyle
PCDDs	polychlorierte Dibenzo- <i>p</i> -dioxine
PCDFs	polychlorierte Dibenzofurane
ppt	parts per trillion (= pg/g)
SI	Stimulations-Index (Ratio: cpm Stimulus/cpm Medium-Kontrolle)
SMR	Serum-Metaboliten-Ratio (Paraxanthin/Koffein)
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo- <i>p</i> -dioxin (TCDD)
UMR	Urin-Metaboliten-Ratio
UMR1	Urin-Metaboliten-Ratio: (AFMU+1U+1X)/17U
UMR2	Urin-Metaboliten-Ratio: (17X+17U)/137X
UMR3	Urin-Metaboliten-Ratio: 17X/137X
1U	1-Methylharnsäure (1-methyluric acid)
17U	1,7-Dimethylharnsäure (1,7-dimethyluric acid)
1X	1-Methylxanthin
17X	1,7-Dimethylxanthin (Paraxanthin)
137X	1,3,7-Trimethylxanthin (Koffein)

9. Danksagung

Diese Untersuchungen waren nur möglich durch die große Kooperationsbereitschaft der TCDD-exponierten Personen in Wien, denen der erste Dank gebührt. Ebenso möchte ich den Kontrollpersonen in Berlin danken.

Bei den Laboruntersuchungen in Berlin danken möchte ich für die engagierte und zuverlässige Arbeit Frau Oberreit und Frau Ellensohn (Immunologische Messungen, Labor der Klinik für Pädiatrische Pneumologie und Immunologie der Charité), Frau Pfundstein (^{13}C -Messung der Atemtestproben, Labor Prof. Dr. M. Becker, Klinik für Allgemeine Pädiatrie der Charité) sowie Herrn Dr. Steffen Bauer (Messung der Koffein-Metaboliten in Serum und Urin, Institut für Klinische Pharmakologie der Charité).

Die Bestimmung der Diphtherie-Antikörper im Serum wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Dr. P. Bartmann (Zentrum für Kinderheilkunde der Universität Bonn) durchgeführt.

An der zuverlässigen Durchführung der Atemtests war wesentlich Cand. med. Yalcin Tosun beteiligt.

Für die Unterstützung und Beratung gilt mein Dank Herrn Dr. Horsch und Herrn PD Dr. Krug im Forschungszentrums Karlsruhe und ebenso Herrn Dr. Wuthe im Sozialministerium des Land Baden-Württemberg, das durch die Bereitstellung der Mittel aus "BWPLUS" diese Untersuchung erst möglich gemacht hat.

Zuletzt gilt mein Dank für die Hilfe bei der Planung und Auswertung sowie für die Unterstützung bei der Diskussion der Ergebnisse des Projektes Prof. emeritus Dr. H. Helge (Kinderklinik des Virchow-Klinikums), Prof. Dr. J. Brockmöller (ehemals Institut für Klinische Pharmakologie der Charité, jetzt Abteilung für Klinische Pharmakologie der Georg-August-Universität Göttingen) sowie der Oberärztin der Immundermatologischen Abteilung der Universität Wien, Frau Dr. A. Geusau, die auch wesentlich an der Durchführung der Untersuchungen in Wien beteiligt war. Für die Gesamtunterstützung des Projektes danke ich Prof. Dr. U. Wahn (Direktor der Klinik für Pädiatrische Pneumologie und Immunologie der Charité) und Prof. Dr. G. Stingl (Leiter der Immundermatologischen Abteilung der Universität Wien).

10. Zusammenfassung

Im Herbst 1997 wurden in Wien mehrere Mitarbeiter eines Textil-Forschungsinstituts auf bislang ungeklärte Weise gegenüber 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (TCDD) exponiert. Die mehrere Monate später erstmals im Blutfett gemessenen TCDD-Werte betrugen bei den 3 höchstbelasteten Angestellten 144.000 (Person 1), 26.000 (Person 2) und 870 ppt (Person 3). Bei Person 1 und 2 wurden somit die höchsten jemals bei Erwachsenen gemessenen TCDD-Werte festgestellt. Person 1 leidet an einer schweren Chlorakne des gesamten Körpers, während die Chlorakne bei Person 2 auf das Gesicht beschränkt war und inzwischen vollständig abgeklungen ist.

Im Rahmen dieses Projektes wurden die genannten 3 Personen genauer untersucht hinsichtlich von Veränderungen des Immunsystems (weißes Blutbild, Granulozyten-Funktion, Lymphozyten-Proliferation und Zytokin-Produktion nach Stimulation mit Mitogenen und Antigenen, Lymphozyten-Subpopulationen, Antikörper-Produktion) und der Cytochrom-P450-Induktion (Koffein-Metabolismus durch CYP1A2, gemessen als ¹³C-Atemtest, Konzentrationsabfall im Serum, Metaboliten-Bildung im Serum und Urin). Zum Vergleich wurde eine altersentsprechende Kontrollgruppe (n=50, davon 30 Nichtraucher und 20 starke Raucher) untersucht. Die Einbeziehung von starken Rauchern bei der Kontrollgruppe zeigte sich als sinnvoll sowohl unter dem Aspekt der Qualitätskontrolle (Bestätigung bekannter Effekte durch Zigarettenrauch) und der Relativierung von (möglichen) TCDD-Effekten. Die Interpretation der Daten bezüglich solcher Effekte bei wurde dadurch erleichtert, daß bei Person 1 und 2 die Höhe der TCDD-Exposition beispiellos ist (ohne Co-Exposition gegenüber anderen persistenten Organochlor-Verbindungen) und es sich um junge Nichtraucher handelt, die vor der Exposition gesund waren. Bei der Untersuchung im Oktober 2000 betrugen die aktuell im Blutfett von den Personen 1, 2 und 3 gemessenen TCDD-Konzentrationen 30.300, 10.100 bzw. 420 ppt.

Insgesamt zeigte die umfangreiche Untersuchung wesentlicher Teile des Immunsystems trotz der extremen TCDD-Exposition bei Person 1 und 2 keine eindeutigen Auffälligkeiten, die auf diese Exposition zurückgeführt werden könnten. Bei Einbeziehung von Voruntersuchungen und von Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen sind möglicherweise die relativ hohe Lymphozytenzahl im peripheren Blut, der relativ niedrige prozentuale Nk-Zell-Anteil bei den Lymphozyten und die erhöhte Lymphozyten-Proliferation nach Mitogen- und Candida-Stimulation als TCDD-Effekte anzusehen. Diese Veränderungen waren jedoch nicht gravierend und lagen im Fall der Candida-Stimulation innerhalb des "Normalbereichs" von Rauchern. Die beobachteten leichten Veränderungen haben sehr wahrscheinlich keine klinische Relevanz, wie auch die bisherige Nachbeobachtung der TCDD-exponierten Personen keinen Anhalt für eine Beeinträchtigung deren Immunsystems bot. Es bestätigte sich somit erneut, daß immunologische Parameter sicherlich nicht als empfindliche Biomarker einer TCDD-Exposition angesehen werden können. Für den Hintergrundbereich kann daher mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Wirkung der Dioxin-Exposition (einschließlich anderer Organochlor-Verbindungen mit Affinität zum Ah-Rezeptor) auf das Immunsystem des Erwachsenen Menschen ausgeschlossen werden. Daß dieses sehr wohl empfindlich bezüglich der Einwirkung von den Fremdstoffen ist,

läßt sich daran ablesen, daß von den ausgewerteten 164 Parametern 34 signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen der Nichtraucher und der Raucher zeigten.

Die CYP1A2-Aktivität der Leber konnte zuverlässig und mit guter Reproduzierbarkeit durch mehrere Methoden als Koffein-Demethylierungsrate gemessen werden (kumulative ^{13}C -Exhalation im Atemtest, Serum-Metaboliten-Ratio: Paraxanthin/Koffein, Koffein-Gesamt-Clearance und Urin-Metaboliten-Ratio UMR1: $\text{AFMU} + 1\text{U} + 1\text{X} / 17\text{U}$), während sich die ebenfalls untersuchten Urin-Metaboliten-Ratios UMR2 und UMR3 (beide mit der Koffein-Konzentration im Nenner) als weniger brauchbar herausstellten. Bei den hoch TCDD-belasteten Personen 1 und 2 konnte eine ca. 10-fache Induktion nachgewiesen werden (im Vergleich zu ebenfalls nichtrauchenden Menschen; Raucher hatten bei den verschiedenen untersuchten Parametern durchschnittlich zwischen 1,4 und 1,8-fach höhere Werte als Nichtraucher). Die Einbeziehung der seit Dezember 1998 bei ihnen mehrfach durchgeführten Voruntersuchungen zeigte, daß trotz mit der Zeit fallender TCDD-Werte die Induktion relativ konstant blieb und in diesem Konzentrationsbereich vermutlich einem Maximum auf einem Plateau entspricht. Weniger eindeutig waren die Ergebnisse der moderat exponierten Person 3, bei der sich reproduzierbar nur für zwei der verwendeten Methoden (kumulative ^{13}C -Exhalation im Atemtest und Urin-Metaboliten-Ratio UMR1: $\text{AFMU} + 1\text{U} + 1\text{X} / 17\text{U}$) eine Induktion im Vergleich zu Nichtrauchern nachweisen ließ. Möglicherweise liegt bei dieser Person eine Abweichung von üblichen Metabolisierungswegen vor. Die Annahme einer im Bereich von 1000 ppt noch nicht sicher vorliegenden Induktion wäre vereinbar mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen. Unter der Annahme, daß neben der CYP-Induktion auch weitere im Tierexperiment zu beobachtende TCDD-Effekte Ah-Rezeptor-vermittelt sind und so Wirkungen im extrem niedrigen Konzentrationsbereich erklären, würde eine Übertragung dieser Erkenntnisse auf den Menschen dessen relative TCDD-Unempfindlichkeit erklären.

Bemerkenswert bleibt somit weiterhin, daß nach Literaturangaben bei empfindlichen Menschen schon TCDD-Konzentrationen um 1000 ppt im Blutfett klinische Symptome in Form von Chorakne auslösen können, während bisher kein Biomarker entdeckt worden ist, der in diesem Konzentrationsbereich eine TCDD-Exposition individuell erkennen könnte. Somit kann für den Hintergrundbereich des Erwachsenen mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, daß TCDD eine relevante Wirkung auf immunologische Parameter oder auf die hepatische CYP1A2-Aktivität hat. Dies gilt auch bei Einbeziehung verwandter Substanzen mit Affinität zum Ah-Rezeptor.